

Mukusinteraktion von Magnetit beladenen kolloidalen Wirkstoffträgern

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Carolin Thum

Saarbrücken

2017

Tag des Kolloquiums:	26.01.2018
Dekan:	Prof. Dr. Guido Kickelbick
Berichterstatter:	Prof. Dr. Marc Schneider
	Prof. Dr. Guido Kickelbick
Vorsitz:	Prof. Dr. Claus-Michael Lehr
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Stefan Boettcher

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2013 bis Juli 2017 am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Philipps-Universität Marburg sowie dem Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Marc Schneider.

Meiner Familie mit großem Dank gewidmet

„Damit das Mögliche entsteht, muss immer wieder das Unmögliche versucht werden.“

Hermann Hesse

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Marc Schneider für die interessante und zugleich herausfordernde Themenstellung sowie die engagierte Betreuung dieser Arbeit bedanken. Neben den konstruktiven Diskussionen, Anregungen und Motivation, schätze ich besonders die Freiräume, die er mir bei der Ausgestaltung der Arbeit entgegenbrachte. Auch für die Unterstützung bei der Anfertigung wissenschaftlicher Publikationen sowie der Möglichkeit meine Arbeit auf internationalen Tagungen zu präsentieren und dabei neue Kontakte knüpfen zu können danke ich ihm sehr.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Guido Kickelbick für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Ein besonderer Dank gilt all meinen Kollegen und Freunden der Schneider-Gruppe sowie den ehemaligen Kollegen aus der Marburgerzeit. Die angenehme, kollegiale und konstruktive Arbeitsatmosphäre ist einfach top gewesen. Ohne Euch, sowohl in fachlichen Fragen, als auch abseits des Instituts wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die Zeit mit Euch war einfach super! Besonders erwähnt seien hier Agnes Weiß und Nashrawan Lababidi, meine beiden Büro-Leidensgenossen, die immer ein offenes Ohr hatten und mich bei dem einen oder anderen Forschungsrückschlag wieder motivierten. Ebenso möchte ich Aljoscha Könneke und Marcel Pourasghar für ihre stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken. Danke insbesondere für die Hilfe mit den REM-Aufnahmen, bei diversen PC-Problemchen und so mancher Chemie- und „Apothekerfrage“. Dr. Sarah Barthold danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Studentenpraktika. Dr. Daniel Primaveß möchte ich für die Synthese und Zurverfügungstellung des Rhodamin B markierten PLGA danken. Nazende Günday Türeli danke ich für die Synthese und Zurverfügungstellung des Ciprofloxacin-SDS-Komplexes sowie der Weitergabe der entwickelten und validierten HPLC-Methode zur Quantifizierung dieses Komplexes. Dr. Afra Torge danke ich für die Einweisung und die Etablierung der besagten HPLC-Methode in unsere Laboratorien. Dear Dr. Chen Shi, thank you so much for the good teamwork, especially regarding our paper.

Ein großer Dank geht auch an die Techniker Peter Meiers und Marijas Jurisic. Egal ob CLSM-Fragen oder mal wieder ein Set-up Problem für das man wieder was aus dem Baumarkt oder Handwerkskoffer braucht – Ihr habt mir immer geholfen. Vielen lieben Dank dafür! Frau Isabelle Conrad-Kehl danke ich für ihre Hilfe bei den zahlreichen Verwaltungsaufgaben und für das gelegentliche Mitbringen ihrer berühmt-berüchtigten Tarte au Chocolat – unglaublich lecker!

Darüber hinaus möchte ich mich bei den verschiedenen Arbeitsgruppen und Institutionen, mit denen ich im Laufe meiner Doktorarbeit zusammengearbeitet habe, für die gute und konstruktive Kooperation bedanken.

Der Arbeitsgruppe Biophotonik an der Philipps-Universität Marburg, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Parak, möchte ich an dieser Stelle für die Synthese und Zurverfügungstellung der Magnetit-NP sowie deren quantitative Analyse mittels ICP-MS danken. Besonders erwähnt seien hier Qian Zhang für die Partikelsynthese, Karsten Kantner für die Analytik sowie Dr. Beatriz Pelaz für die Zusammenarbeit im Rahmen der gemeinsamen Publikation.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Sandra Schäfer und dem Leiter der Anorganischen Festkörperchemie an der Universität des Saarlandes, Herrn Prof. Dr. Kickelbick, für die Synthese und Zurverfügungstellung der Magnetit-NP bedanken.

Bei Frau Dr. Claudia Fink-Straube, Leiterin der Chemischen Analytik am INM, möchte ich mich für die quantitative Eisenbestimmung unter Verwendung der HR-CS-AAS bedanken.

Herrn Dr. Andreas Schaper, Leiter des Labors für Elektronenmikroskopie und Mikroanalyse am Zentrum für Materialwissenschaften der Philipps-Universität Marburg, sowie Herrn Michael Hellwig danke ich für die Einweisung und Hilfe am TEM. Ebenso danke ich Herrn Jörg Schmauch für die Einweisung zur Nutzung des TEM an der Universität des Saarlandes.

Frau Johanna Nothacker, Doktorandin der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Annette M. Schmidt am Institut für Physikalische Chemie der Universität zu Köln, danke ich für die VSM-Messungen.

Bei der Glasbläserwerkstatt der Universität des Saarlandes bzw. bei Herrn Günther Berlin möchte ich mich für die Anfertigung der von mir konstruierten Vakuumkammer bedanken. Der Pferdeklinik Altforweiler danke ich für die Zurverfügungstellung der Mukusproben.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen ehemaligen Studenten Bianca Haase, Paula Weimann, Nico Strack sowie meinem ehemaligen Diplomanten Aljoscha Könneke recht herzlich für ihre experimentellen Arbeiten im Labor danken. Ich hoffe, ich konnte euch das wissenschaftliche Arbeiten etwas näher bringen und ihr hattet bei der Laborarbeit auch Spaß!

Meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Onkel und natürlich meiner Omi danke ich von ganzem Herzen für die bedingungslose Unterstützung, die immer offenen Ohren und die Motivation über die gesamte Zeit meiner akademischen Ausbildung. Mir ist bewusst, dass das nicht selbstverständlich ist und ich mich glücklich schätzen kann, solch eine Familie zu haben. Meinem Freund Daniel danke ich zu tiefst für die Geduld und Motivation in den letzten Monaten, auch wenn es nicht immer einfach war.

Ihr alle habt maßgeblich zum erfolgreichen Beenden dieser Arbeit beigetragen.

Vielen lieben Dank!

Abkürzungsverzeichnis

ASL	airway surface liquid
Bq.	Bezugsquelle
CCD	charge-coupled device
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cipro	Ciprofloxacin
CLSM	confocal laser scanning microscopy
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FDA	Food and Drug Administration
HCl	Chlorwasserstoff
HEC	Hydroxyethylcellulose
HF	Hochfrequenz
HPLC	high pressure liquid chromatography
HR-CS-AAS	high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
IH	induktive Heizbedingungen
LM	Lösemittel
NAC	N-Acetylcystein
NAL	Nacystelyn
NP	Nanopartikel
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCL	periciliary liquid layer
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex

PEG	Polyethylenglycol
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RhoB	Rhodamin B
RP-HPLC	reversed-phase high pressure liquid chromatography
RT	Raumtemperatur
SAR	specific absorption rate
Sdp.	Siedepunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEDDS	self-emulsifying drug delivery systems
SPIONs	Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
VSM	vibrating sample magnetometer
XRD	X-ray diffraction
ZF	Zystische Fibrose

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
Kurzzusammenfassung	VII
Abstract	VIII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Pulmonale Arzneistoffapplikation.....	3
1.1.1 Anatomie und Physiologie der menschlichen Lunge	3
1.1.2 Reinigungsmechanismen der Lunge - mukoziliäre Clearance im Fokus	4
1.1.3 Die Lunge als Applikationsort: Potential und Anforderungen.....	9
1.2 Pulmonaler Wirkstofftransport.....	12
1.2.1 Moderne Wirkstoffträgersysteme für die pulmonale Applikation	12
1.2.2 Aktuelle Überwindungsansätze der Mukusbarriere	14
1.3 Magnetische Nanopartikel.....	16
1.3.1 Magnetische Nanopartikel: Begriffsklärungen und Eigenschaften.....	16
1.3.2 Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Magnetit im Fokus	20
1.3.3 SPIONs im pharmazeutisch-medizinischen Anwendungskontext	22
1.4 Zielsetzung der Arbeit und Vorgehensweise.....	23
2 Material und Methoden	26
2.1 Verwendete Materialien	26
2.1.1 Chemikalien.....	26
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Biologisches Material.....	29
2.2 Charakterisierungsmethoden	29
2.2.1 Dynamische Lichtstreuung.....	30
2.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie	30
2.2.3 Rasterelektronenmikroskopie	32
2.2.4 Vibrationsmagnetometer	33
2.2.5 Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie.....	34
2.2.6 Hochauflösende Kontinuumstrahler-Atomabsorptionsspektrometrie	34
2.2.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie	35
2.3 Experimentelle Methoden	36
2.3.1 Herstellung magnetischer Nanokomposite.....	36

2.3.1.1	Nanopräzipitation: Kurzvorstellung der Herstellungsmethode	36
2.3.1.2	Herstellung von Magnetit-PLGA-Nanopartikeln	37
2.3.1.3	Herstellung von fluoreszierenden Magnetit-PLGA-Nanopartikeln.....	39
2.3.1.4	Herstellung von Cipro co-beladenen Magnetit-PLGA-Nanopartikeln.....	39
2.3.1.5	Aufreinigung, Trocknung und Aufkonzentrierung der Partikel	40
2.3.1.6	Berechnung der Kennzahlen, Beladung und Einkapselungseffizienz	41
2.3.2	Induktives Heizen magnetischer Nanokomposite.....	42
2.3.2.1	Etablierung eines Setups zum induktiven Heizen.....	42
2.3.2.2	Identifikation von Einfluss- und geeigneten Heizparametern	45
2.3.2.3	Induktionserwärmung magnetischer Nanokomposite	46
2.3.3	Induktionserwärmung und Partikelmigrationsverhalten in Mukus	47
2.3.3.1	Etablierung eines Setups zur Untersuchung der Partikelmigration	47
2.3.3.2	Einfluss von Wärme auf die Partikelpenetration in HEC und Mukus	50
2.3.3.3	Partikelpenetration unter induktiven Heizbedingungen	51
3	Ergebnisse und Diskussion.....	52
3.1	Herstellung von magnetischen Nanokompositen	52
3.1.1	Magnetit-PLGA-Nanopartikel	52
3.1.2	Magnetit-Rhodamin B PLGA-Nanopartikel.....	58
3.1.3	Co-Verkapselung von Ciprofloxacin	59
3.2	Induktives Heizen magnetischer Nanopartikel	63
3.2.1	Vorversuche zur Etablierung eines Setups zum induktiven Heizen	63
3.2.2	Evaluierung von Heizverhalten beeinflussender Parametern	65
3.2.2.1	Einfluss der Konzentration an Magnetit-NP	65
3.2.2.2	Einfluss der Heizleistung	68
3.2.3	Heizverhalten von Magnetit-PLGA-Nanopartikel.....	70
3.2.4	Heizverhalten von Magnetit-RhoBPLGA-Nanopartikel	72
3.3	Induktives Heizen zur Verbesserung der Mukuspenetration	73
3.3.1	Einfluss einer Gesamterwärmung auf die Partikelpenetration im Modellgel.....	73
3.3.2	Einfluss einer Gesamterwärmung auf die Partikelpenetration im Mukus	75
3.3.3	Einfluss der Wärmeinduktion auf die Partikelmigration in HEC/ Mukus.....	78
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	81
	Literaturverzeichnis.....	87
	Publikationen und Tagungsbeiträge	98

Kurzzusammenfassung

Die pulmonale Wirkstoffapplikation gewinnt zunehmend an Bedeutung. Die Mukusbarriere, eine der wichtigsten nicht-zellulären Barrieren, limitiert jedoch eine effiziente Pharmakotherapie. Der viskose Schleim überzieht das Lungenepithel und fängt inhalierte Fremdpartikel ab, die dann abtransportiert werden. Diesem Schicksal unterliegen auch inhalierte Arzneistoffpartikel. Die Arbeit setzt an dieser Problematik an. Der vorgestellte Ansatz sieht eine wärmeinduzierte Penetrationsverbesserung dieser Barriere vor. Die intendierte Erwärmung soll lokal und induktiv über ein sich im externen Wechsellmagnetfeld aufheizendes Wirkstoffträgersystem erfolgen. Ein solches System konnte auf Basis von PLGA und Magnetit entwickelt werden. Die PLGA-Magnetit-NP sind sphärisch, ca. 200 nm groß und induktiv heizbar. Eine Co-Beladung mit Cipro ist möglich, bedarf jedoch weiterer Optimierung. Angestrebt wurde dies zur Behandlung von Pseudomonasinfektionen bei Mukoviszidose-Patienten. Die grundlegende Hypothese, dass die Mukusbarriere unter Wärmeeinfluss besser zu penetrieren ist, konnte unter externer Wärmeapplikation bewiesen, jedoch nicht unter induktiven Heizbedingungen gezeigt werden. Hierfür kommen mehrere Faktoren in Betracht, die es zu untersuchen gilt. Festzuhalten bleibt, dass der Wärmeeinfluss auf die Penetration in einer grundsätzlichen Machbarkeitsstudie nachgewiesen werden konnte. Ein erster Schritt, um den neuartigen Ansatz zur Überwindung der Mukusbarriere voranzutreiben.

Abstract

Pulmonary drug delivery is gaining increased attention. However, an effective pharmacotherapy is limited due to the mucus barrier, one of the most important non-cellular barriers. Mucus is a viscous secretion that covers the surface of the lung airway. Its function consists of trapping foreign materials which are then removed. This can happen to inhaled drugs as well. This thesis aims at presenting a novel strategy to face this problem. In order to overcome the mucus barrier, a penetration enhancement induced by heat is considered. The intended heating is to be carried out locally and inductively via an active drug carrier system which heats up in the external alternating magnetic field. For this, it was possible to develop a carrier system based on PLGA and Magnetite. The PLGA-Magnetite-NP are spherical, 200 nm in size and heat inductively. Co-loading with Cipro is possible. However, further action is needed. The aim was to create a system for treating cystic fibrosis patients with a *pseudomonas* infection. Regarding the hypothesis that the mucus barrier is better to penetrate by the influence of heat, it was shown that this effect could be demonstrated by applying external heat. However, this correlation was not found by induction heating. On this basis, several factors should be taken into account. In conclusion, it can be ascertained that heat influences the penetration; one of the preliminary steps in promoting this novel approach to overcoming the mucus barrier.

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Lunge als Applikationsort für Arzneistoffe birgt ein großes Potential und gewinnt zunehmend an Bedeutung. Die einfache, nicht-invasive Zugänglichkeit, die große Resorptionsfläche, die gute Vaskularisierung sowie die Umgehung des First-Pass-Effekts sind nur einige der Attribute welche, die Lunge zu einer idealen Plattform für die lokale und systemische Arzneimitteltherapie machen.^[1, 2]

Die inhalative Therapie bei chronischen Lungenerkrankungen, wie COPD, zystische Fibrose oder Asthma bronchiale ist eine seit Jahrzehnten etablierte Behandlungsform. Die entsprechenden Wirkstoffe werden mithilfe von Dosieraerosolen oder Pulverinhalatoren, in fester oder flüssiger Form, in die Lunge eingebracht und können so direkt am Wirkort lokal wirken. In diesem Zusammenhang wird derzeit auch die lokale inhalative Behandlung von Lungenkrebs diskutiert.^[3, 4] Darüber ließe sich die Therapieeffizienz, verglichen mit derzeitigen Standardtherapieformen, wie der Strahlentherapie und der systemischen Chemotherapie, womöglich deutlich steigern.^[5] Durch lokal applizierte Wirkstoffe lässt sich im Allgemeinen die eingesetzte Dosis und damit korrelierend auch die systemischen Nebenwirkungen verringern. Vor diesem Hintergrund wird derzeit die lokale Therapie vieler weiterer Lungenerkrankungen erwogen. Ein besonderer Fokus aktueller Forschungsbestrebungen liegt hierbei auf inhalativen Antibiotikatherapien, beispielsweise zur Behandlung diverser Pneumonie Arten^[6] oder Tuberkulose.^[7]

Neben der lokalen Wirkstoffapplikation kann die Lunge aber auch gezielt als Applikationsroute für eine beabsichtigte systemische Wirkung genutzt werden. Inhalationsnarkotika sind dafür ein bewährtes Beispiel. In den letzten Jahren hat diese Form der Wirkstoffapplikation ein nahezu sprunghaft gesteigertes Interesse erfahren. Die pulmonale Applikationsroute ist besonders für Wirkstoffe interessant, die durch die perorale Gabe zerstört würden und daher invasiv verabreicht werden müssen. Protein- und Peptidwirkstoffe sind prominente Vertreter solcher Wirkstoffkandidaten. Aus diesem Bestreben heraus resultierte mit Exubera® im Jahre 2006 das erste inhalierbare Humaninsulin zur Behandlung von Diabetes mellitus. Ein Inhalanda, welches das Potential der Lunge als systemischer Applikationsweg deutlich aufzeigt. Zahlreiche Forschungsbemühungen konzentrieren sich aktuell auf die Möglichkeit über die Lunge eine systemische Wirkung zu erzielen. Das Spektrum an Erkrankungen die darüber zukünftig adressiert, beziehungsweise therapiert werden sollen ist beachtlich.^[2, 8] Erforscht werden derzeit alternative inhalative Therapieansätze u. a. für Parkinson^[9], Schlafstörungen^[10], Migräne^[11] oder zur Raucherentwöhnung.^[12] Die pulmonale Vakzinierung stellt ein weiterer vielversprechender Ansatz in diesem Kontext dar.^[13, 14]

Bezugnehmend darauf lässt sich festhalten, dass die pulmonale Wirkstoffapplikation, sowohl für die lokale Therapie, als auch zur Behandlung systemischer Erkrankungen zukünftig großes Potential verspricht. Doch um dieses Potential ausschöpfen zu können und der jeweiligen Anwendung gerecht zu werden, müssen Herausforderungen entgegengetreten werden, die den therapeutischen Nutzeffekt von Inhalanda derzeit einschränken. Die Reinigungsmechanismen der Lunge stellen eine solche Herausforderung dar.^[1] Mit dem Ziel den Organismus vor inhalierten Fremdpartikeln und Pathogenen zu schützen, ist die Lunge mit äußerst effizienten Schutz- und Abwehrmechanismen ausgestattet. Im Alveolarbereich, vermittelt durch Makrophagen, wird die obere Lunge durch den Mechanismus der sogenannten mukoziliären Clearance gereinigt. Dabei überzieht ein viskoser Schleim, der sogenannte Mukus, den Bronchialbereich und trägt dafür Sorge inhalede Partikel abzufangen. Durch die Flimmerzellen des respiratorischen Epithels, genauer gesagt durch die Schlagbewegung der an der Oberfläche dieser Zellen angebrachten Zilien, wird dieser Schleim samt inkorporierten Partikeln abtransportiert. Ein Reinigungsmechanismus der nicht nur Pathogene und Fremdpartikel betrifft, sondern auch einer effizienten pulmonalen Wirkstoffapplikation entgegensteht. Diverse Forschungsstrategien zielten in den letzten Jahrzehnten auf eine Verbesserung der Inhalationstherapie ab. Dabei konzentrierte man sich vornehmlich auf die freigesetzte Dosis, die Arzneistoffdeposition innerhalb der Lunge und damit zusammenhängend das Partikeldesign und die Weiterentwicklung des Applikationssystems. Dies sind zweifellos therapeutisch wichtige Aspekte. Nur wenn der Arzneistoff in dem für die Indikation relevanten Bereich der Lunge abgeschieden wird, kann die angestrebte topische oder systemische Wirkung überhaupt erzielt werden. Aufgrund dieser Verbesserungsstrategien sind zwar heutzutage höhere Wirkstoffdosen möglich und es wird eine höhere Effizienz der Deposition erreicht, die Umgehung des besagten Reinigungsmechanismus ist bislang jedoch nur unzureichend gelöst. Entsprechend designte, neuartige Wirkstoffträgersysteme im Nanometerbereich, besitzen in diesem Kontext ein vermeintlich hohes Potential. Durch Synergien verschiedener Materialien lassen sich nanoskalige Trägersysteme mit einzigartigen Eigenschaften entwickeln. Trägersysteme mit denen sich zukünftig womöglich die Effizienz der pulmonalen Wirkstoffapplikation und damit der Therapieerfolg diverser Erkrankungen steigern lassen.

1.1 Pulmonale Arzneistoffapplikation

1.1.1 Anatomie und Physiologie der menschlichen Lunge

Die Lunge ist das Organ des äußeren Gasaustauschs. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Sauerstoff (O_2) aus der Umgebung in den Blutkreislauf aufzunehmen und gleichzeitig Kohlenstoffdioxid (CO_2) aus dem Blutkreislauf an die Umgebung abzugeben.

Das Atmungsorgan lässt sich dabei anatomisch und funktionell in den Tracheobronchialbereich und den Alveolarbereich gliedern. Dabei verzweigen sich die Atemwege von der Trachea ausgehend, dichotom in insgesamt 23 Generationen. Die inhalede Luft wird zunächst durch den Nasenrachenraum in die Trachea geleitet. Die Trachea gabelt sich gemäß den beiden Lungenflügeln in die zwei Hauptbronchien auf. Von jedem Hauptbronchus gehen weitere Verzweigungen ab, sodass die Bronchien in kleinere Bronchiolen und schließlich in die Terminalbronchien übergehen. In der 17. Teilungsgeneration geht dieser Tracheobronchialbereich in den Alveolarbereich über (vgl. Abbildung 1). In der bis dahin zurückgelegten Passage wird die Inspirationsluft gefiltert, erwärmt, befeuchtet und somit für den eigentlichen Gasaustausch vorbereitet. Dieser Austausch findet in den Alveolen statt, welche sich an den Endverzweigungen befinden und von einem dichten Netz an Blutkapillaren umgeben sind. Der Sauerstoff tritt in den luftgefüllten Alveolen in die angrenzenden Lungenkapillaren über. Nach dem gleichen Prinzip tritt das Kohlenstoffdioxid vom Blut in die Lunge und wird letztlich über Exhalation abgeatmet.^[15]

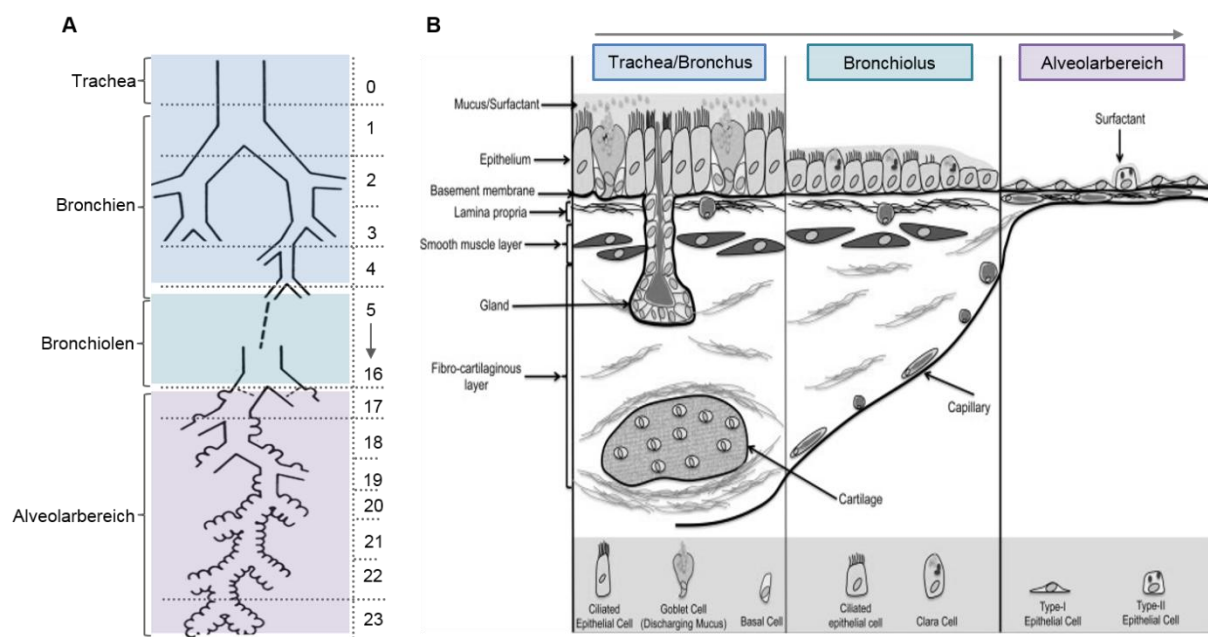


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gliederung des Atemwegs mit seinen 23 Verzweigungen (A) sowie die in den einzelnen Abschnitten anzutreffenden Epitheltypen (B). Abbildung A ist modifiziert und reproduziert nach Weibel^[16], mit freundlicher Genehmigung der American Thoracic Society. Abbildung B ist modifiziert und reproduziert nach Klein et al.^[17] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Die Zahl dieser Alveolen wird auf 150-200 Millionen geschätzt. Daraus resultiert eine Gasaustauschfläche von 70-140 m².^[18] Gemäß den unterschiedlichen Aufgaben unterscheidet sich auch das Oberflächenepithel der einzelnen Lungenabschnitte bezüglich Form und Ausführung stark.

Im Allgemeinen nimmt der Gesamtquerschnitt des Atemwegsystems zu und die Epitheldicke mit zunehmender Verzweigung ab (siehe Abbildung 1). Das alveoläre Epithel ist ausgesprochen dünn, sodass der dort stattfindende Gasaustausch mit dem Blut über Diffusion erfolgen kann. Die Blut-Luft-Schranke, welche die beiden Atemgase überwinden müssen ist nur zwischen 0,2-0,6 µm breit.^[18] Das Epithel im Alveolarbereich ist ein einschichtiges Plattenepithel, welches hauptsächlich aus Pneumozyten Typ I sowie den Surfactant-sezernierende Typ II-Pneumozyten besteht. Das an der Oberfläche dieses Epithels abgeschiedene Surfactant dient u. a. der Reduktion der Oberflächenspannung der Alveolen. Dadurch wird sichergestellt, dass diese nach vollständiger Expiration nicht kollabieren. Zudem finden sich im Alveolarbereich, diesen Alveolarepithelzellen aufsitzend, Makrophagen, die für die Reinigung in dieser Lungenregion verantwortlich sind.^[19]

Das respiratorische Epithel der zuführenden Atemwege ist hingegen dicker und hat eine andere zelluläre Zusammensetzung. Im Allgemeinen nimmt die Epitheldicke in Richtung absteigendem Bronchialbaum ab. Dies geht auch aus der schematischen Darstellung in Abbildung 1 hervor. Das respiratorische Epithel der Trachea und der Bronchien ist ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel, welches vor allem durch Flimmerzellen und Becherzellen charakterisiert ist. Im Bereich der Bronchiolen findet sich ein einschichtiges prismatisches Epithel, das Flimmer und Clara-Zellen enthält. Die Präsenz der Flimmerzellen sowie der flüssigkeitsproduzierenden Zellen im Tracheobronchialbereich ist für die Filterung der Atemluft essentiell. Der zugrundeliegende Reinigungsmechanismus in diesem Bereich der Lunge wird als mukoziliäre Clearance bezeichnet und ist im nachfolgenden Kapitel eingehend beschrieben.

1.1.2 Reinigungsmechanismen der Lunge - mukoziliäre Clearance im Fokus

Die Lunge steht aufgrund ihrer physiologischen Funktion im stetigen Austausch mit ihrer Umgebung. Um den Organismus von inhalierten Fremdpartikeln, wie beispielsweise Staub oder Mikroorganismen zu schützen, verfügt die Lunge über äußerst effiziente Abwehr- und Schutzmechanismen. Je nachdem in welchem Abschnitt der Lunge die entsprechenden Partikel abgeschieden werden, greifen unterschiedliche Mechanismen. In den luftleitenden Atemwegen, im vorherigen Abschnitt als Tracheobronchialbereich bezeichnet, ist dies die mukoziliäre Clearance. Partikel, die hingegen die tiefe Lunge, den Alveolarbereich erreichen, unterliegen einem Makrophagen-vermittelten Reinigungsmechanismus.^[20] Dabei ist Art und Ursprung der Partikel für beide Mechanismen absolut irrelevant – Arzneistoffpartikel unterliegen diesen Mechanismen ebenso wie pathogene Objekte. Für inhalierte Partikel stellen beide Mechanismen nicht-zelluläre Barrieren in der Lunge dar. In Abbildung 2 ist der

Reinigungsweg eines wirkstoffbeladenen Arzneistoffträgerpartikel in Abhängigkeit von dessen Deposition in der Lunge schematisch dargestellt. Löst sich der Arzneistoffträgerpartikel nicht direkt nach der Deposition auf, wird er in der tiefen Lunge durch Makrophagen aufgenommen oder im Tracheobronchialbereich über die mukoziliäre Clearance aus der Lunge abtransportiert. Die Verweildauer eines in der Lunge abgeschiedenen Partikels ist somit von dem an der jeweiligen Depositionsstelle vorherrschenden Reinigungsmechanismus abhängig. Für das Verständnis der weiteren Arbeit ist insbesondere die mukoziliäre Clearance von Bedeutung. Aufgrund dessen wird der Reinigungsmechanismus des Tracheobronchialbereichs nachfolgend detaillierter beschrieben.

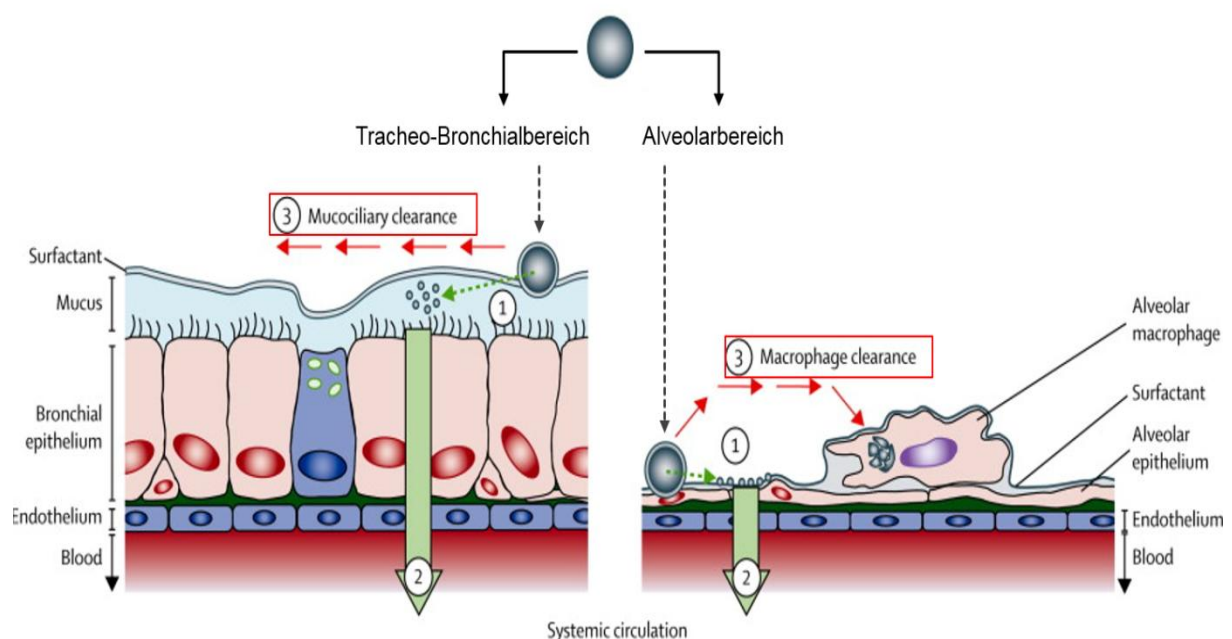


Abbildung 2: Vergleichende Darstellung der Reinigungsmechanismen der Lunge in Abhängigkeit der Deposition eines Arzneistoffträgerpartikel (modifiziert und reproduziert nach Ruge et al. ^[20], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier). Wird ein wirkstoffbeladener Arzneistoffträgerpartikel (1) im Tracheobronchialbereich abgeschieden unterliegt er dem mukoziliären Reinigungsmechanismus (3), wohingegen er in der tiefen Lunge einem Makrophagen-vermittelten Reinigungsmechanismus (3) unterliegt. Durch beide Reinigungsmechanismen wird letztlich die Wirkstoffaufnahme in den Organismus beeinflusst bzw. eingeschränkt.

Mukoziliäre Clearance und deren Bedeutung am Fallbeispiel zystische Fibrose

Die mukoziliäre Clearance ist der wichtigste Reinigungsmechanismus der luftleitenden Atemwegsabschnitte. Die Begrifflichkeit „mukoziliär“, abgeleitet vom lateinischen Wort Mucus (Schleim) und dem Begriff „Zilie“, indiziert die für diese Art der Reinigung wesentlichen Komponenten. Das respiratorische Epithel des Tracheobronchialbereichs besteht hauptsächlich aus zwei Zelltypen, Drüsen- und Flimmerepithelzellen.^[21] Einer der Hauptvertreter dieser exokrinen Drüsenzellen sind die sogenannten Becherzellen, die ca. 20% des Epithels ausmachen. Dieser Zelltyp sezerniert Muzine, ein wesentlicher Bestandteil der die Oberfläche

des Epithels überziehenden Schleimschicht. Hauptaufgabe dieser ist es, inhalierte Fremdpartikel, wie beispielsweise Staub oder Mikroorganismen abzufangen, um so das unterliegende Epithel zu schützen. Diese Schleimschicht lässt sich in zwei Bereiche gliedern (Abbildung 3A). In unmittelbarer Nähe zu den Zilien findet sich eine wässrige Sol-Schicht, welche die Zilienbewegung nicht einschränkt. Dieser periziliären Flüssigkeitsschicht, kurz PCL-Schicht (periciliary liquid layer), liegt die wesentlich viskosere Mukusschicht auf.^[22] Der genaue Aufbau dieser beiden, zusammengefasst als ASL-Schicht (airway surface liquid) bezeichneten Schicht, wird derzeit noch kontrovers diskutiert.^[23, 24]

Neben Drüsenzellen bilden die sogenannten Flimmerepithelzellen den Hauptbestandteil des Epithels.^[25] Daher wird das respiratorische Epithel auch als Flimmerepithel bezeichnet. Flimmerepithelzellen weisen an ihrer Oberfläche feine Flimmerhärchen, sogenannte Kinozilien, auf. Diese Zilien schlagen koordiniert in metachronen Bewegungswellen. Je nach Region des Tracheobronchialbereichs erfolgt dies mit einer Frequenz von ca. 5 - 15 Schläge/s.^[26, 27] Die die Flimmerepithelzellen bedeckende Mukusschicht wird dadurch stetig in Richtung Mund-Rachenraum abtransportiert. Darin abgefangene und inkorporierte Fremdpartikel werden dann entweder durch Husten oder Schlucken aus dem Respirationstrakt entfernt. Die Transportgeschwindigkeit dieser Mukusschicht ist von der jeweils betrachteten Region im Tracheobronchialbereich abhängig und liegt in einem Bereich von ca. 2 - 22 mm/min.^[28-30] Die wichtigsten Komponenten der mukoziliären Clearance ist in Abbildung 3A schematisch zusammengefasst.

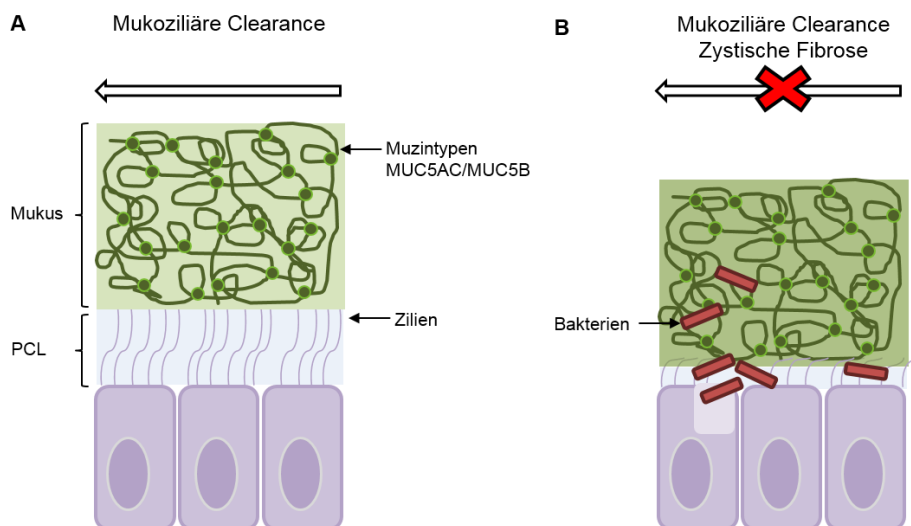


Abbildung 3: Schematische Darstellung der mukoziliären Clearance im gesunden Zustand (A) und im Falle von zystischer Fibrose (B). Gezeigt ist die ASL-Schicht, bestehend aus der periziliären Flüssigkeitsschicht (PCL) und der Mukusschicht. Ebenso sind die für den Gelcharakter des Mukus hauptverantwortlichen Muzintypen MUC5AC und MUC5B indiziert. Bei der zystischen Fibrose ist die mukoziliäre Clearance stark vermindert. Ursache ist eine genetisch bedingte Funktionsstörung des CFTR-Kanals, wodurch der Ionentransport gestört und infolgedessen die schützende Schleimschicht wesentlich viskoser ist. Durch die hohe Viskosität kommt der ziliäre Transport zum Erliegen. Dies begünstigt letztlich bakterielle Infektionen.

Für eine effektive Reinigung ist, sowohl eine adäquate Mukusproduktion, als auch eine intakte Funktion der Zilien die Grundvoraussetzung.^[31, 32] Dies wird vor allem deutlich bei Defekten, die eine der beiden Kernkomponenten dieses Reinigungsapparats betrifft. Die Stoffwechselerkrankung zystische Fibrose ist dafür ein geeignetes Fallbeispiel.^[33] Bei dieser Erkrankung ist aufgrund eines genetischen Defektes die mukoziliäre Clearance beeinträchtigt (siehe Abbildung 3B). Indiziert durch eine Mutation im CFTR-Gen (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), welches den CFTR-Kanal codiert, resultiert eine wesentlich viskosere ASL-Schicht. Bei dem CFTR-Kanal handelt es sich um einen Chloridionenkanal, der durch die Mutation in seiner Funktionsweise gestört wird. Aufgrund dessen ist die Regulation des Salzhaushaltes gestört. Die dem Epithel aufliegende ASL-Schicht dehydriert infolgedessen, wodurch die PCL-Schicht reduziert und der ihr aufliegende Mukus viskoser wird. Die Konsequenz dieser Dehydrierung und der darauf basierenden Viskositätssteigerung der Schleimschicht ist eine starke Beeinträchtigung des ziliären Transports. Der dadurch bedingt verminderte Abtransport stellt eine ideale Basis für eine Infektion mit Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* dar.^[33, 34] Derartige Infektionen resultieren bei den betroffenen Patienten häufig in einer stetig abnehmenden Lungenfunktion. Das Fallbeispiel zystische Fibrose zeigt deutlich die Wichtigkeit einer funktionierenden, mukoziliären Clearance auf.

Mukus: Zusammensetzung und Struktur

Epithelien die mit der Außenwelt in Kontakt stehen, erfüllen aufgrund bestimmter Barriereigenschaften immer eine Schutzfunktion. Im Falle des respiratorischen Epithels entspricht diese Barriere einem viskosen schleimartigen Sekret – dem sogenannten Mukus. Diese Mukusschicht überzieht das Epithel der luftleitenden Abschnitte der Atmungsorgane und schützt darüber den Organismus gegen inhalierte Fremdpartikel.

Der respiratorische Mukus besteht zu ca. 97% aus Wasser mit einem Feststoffanteil von ca. 3%. Nahezu ein Drittel dieses Feststoffanteils stellen sogenannte Muzine dar. Darüber hinaus enthalten sind Lipide, andere Proteine, Salze, DNA, Zellen sowie Zellmaterial.^[33, 35] Den enthaltenen Muzinen kommt eine besondere Bedeutung zu. Die multifunktionellen Glykoproteine stellen den strukturellen Bestandteil von Mukus dar, verhindern aufgrund der hohen Wasserbindungskapazität dessen Dehydrierung^[36] und sind vermutlich für die eigentliche Bindung der inhalierten Fremdpartikel verantwortlich.^[37] Insgesamt 17 Gene codieren im menschlichen Organismus für Muzine. In der Lunge werden zwei Muzintypen besonders stark exprimiert – MUC5AC und MUC5B.^[33, 38] Beide Muzintypen sind durch terminale cysteinreiche Domänen charakterisiert, was sie dazu befähigt Disulfidbrücken auszubilden und sich zu Polymeren zu verbinden. Diese Polymerstrukturen stellen die wesentliche Grundlage für die viskoelastischen Eigenschaften und den Hydrogelcharakter des Mukus dar.^[38] Die fortlaufende Sekretion dieser Muzine erfolgt, wie erwähnt, in Becherzellen und anderen submukösen Drüsenzellen. Im Respirationstrakt werden bei einem gesunden Menschen ca. 10 -

100 ml Mukus pro Tag produziert.^[22] Neben der chemischen Zusammensetzung dieser nicht-zellulären biologischen Barriere rücken zunehmend deren physikalische Eigenschaften sowie die innere Struktur in den Fokus aktueller Forschungsbemühungen. Eine genaue Kenntnis darüber hilft möglicherweise zu verstehen, welche Partikelgröße vom Mukus bevorzugt eingeschlossen wird oder wie die Partikeloberfläche die Mobilität im Mukus beeinflusst. Beides Aspekte, die derzeit noch unklar, aber zur therapeutisch intendierten Überwindung dieser Barriere von großer Bedeutung sind.^[39]

Bekannt ist, dass die beiden Muzintypen MUC5AC und MUC5B als prädominante Faktoren die Gelbildung von respiratorischem Mukus verantworten. Eine neue Studie indiziert, dass auch weitere im Mukus enthaltene Proteine an der Ausbildung des dreidimensionalen Polymernetzwerks beteiligt sind. Globuläre Proteine, so konnte gezeigt werden, interagieren mit Muzinen durch schwache elektrostatische aber auch durch starke hydrophobe oder kovalente Wechselwirkungen und bestimmen somit die biophysikalischen Eigenschaften von Mukus sehr wahrscheinlich mit.^[40] Bei dem Gelnetzwerk von respiratorischem Mukus handelt es sich um ein heterogenes Netzwerk. Darauf lassen rheologische Untersuchungen schließen, welche die Makrorheologie mit der Mikrorheologie von Mukus vergleichen.^[41, 42] Unter makroskopischer Betrachtung, d. h. als Bulk-Material, wird Mukus als ein viskoelastisches Gel beschrieben, das ein nichtnewtonsches Verhalten zeigt. Basierend auf entsprechenden Messungen bewegt sich die Viskosität von Mukus zwischen 10^{-2} und 10^2 Pas was die Viskosität von Wasser bis um das 2000 fache übersteigt. Diese Viskosität würde eigentlich die beobachtbare schnelle Diffusion bestimmter Partikel in Mukus ausschließen. Da diese jedoch offensichtlich stattfindet, reicht die Makrorheologie nicht aus um diese biologische Barriere adäquat zu charakterisieren.^[35] In der Mikrorheologie versucht man Informationen über lokale mechanische Eigenschaften, die Strukturreologie, zu erhalten. Mikrorheologische Untersuchungen an Mukus zeigen eine klare Diskrepanz zu dem makrorheologischen Verhalten.^[41, 42] Ferner legen diese Studien offen, dass das Muzinnetzwerk, welches diesem Hydrogel seine Struktur gibt, sehr starr ist und insgesamt durch eine hohe Heterogenität charakterisiert ist. Festmachen lässt sich diese heterogene Natur an der breitverteilten Maschenweite des Netzes (siehe Abbildung 4). Dies konnte anhand von Mikrostrukturvisualisierungen unter Verwendung der Kryoelektronenmikroskopie nachgewiesen werden.^[42] Möglicherweise ist die Struktur von Mukus noch wesentlich komplexer als bisher angenommen. Eine aktuelle Arbeit postuliert basierend auf rheologischen Untersuchungen anstelle einer dreidimensionalen Netzstruktur eine Schwamm- oder Kammerstruktur.^[41] Diese könnte eine Erklärung dafür liefern, weshalb manche Partikel die Mukusbarriere penetrieren können und andere nicht. Für die therapeutisch intendierte Überwindung dieser Barriere ist deren vollständige Charakterisierung essentiell. Nur so lassen sich pharmazeutisch-technologische Ansätze entwickeln um diese Barriere effizient zu überwinden.

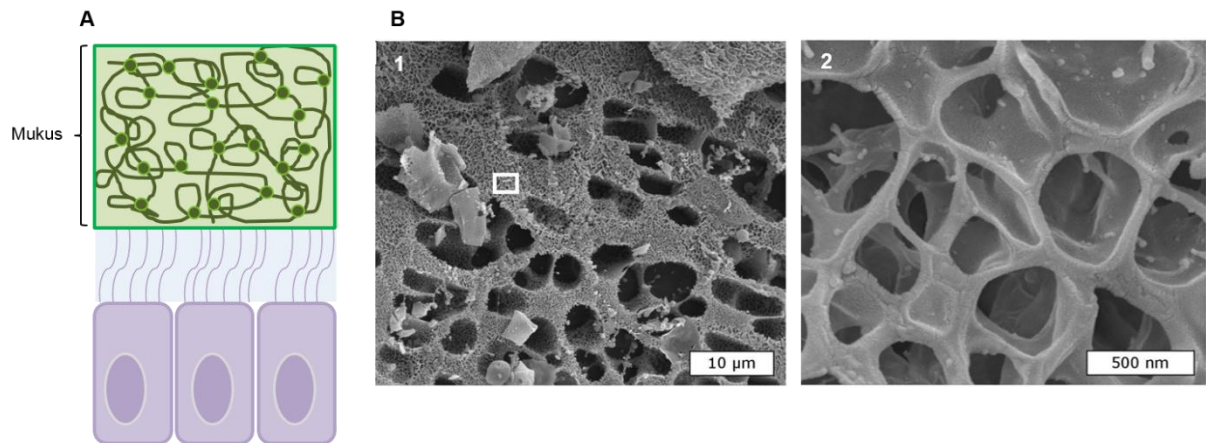


Abbildung 4: Schematische Darstellung der dem respiratorischen Epithel aufliegenden Mukus (A) sowie die Mikrostrukturvisualisierung dieser Mukusschicht unter Verwendung der Kryo-Elektronenmikroskopie (B). Die Aufnahme B-2 ist dabei ein Vergrößerungsschnitt der in Aufnahme B-1 indizierten Fläche. Die gezeigten kryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden modifiziert und reproduziert nach Kirch et al. ^[42], mit freundlicher Genehmigung von PNAS.

1.1.3 Die Lunge als Applikationsort: Potential und Anforderungen

Die Lunge als Applikationsort ermöglicht aufgrund ihrer anatomischen Beschaffenheit die Pharmakotherapie lokaler Lungenerkrankungen ebenso wie die Behandlung systemischer Erkrankungen. Im Falle der Lokalthherapie von Lungenerkrankungen, wie beispielsweise Asthma bronchiale oder COPD, gelangt durch die inhalative Applikation der entsprechende Wirkstoff direkt an den Wirkort. Dadurch wird eine lokale Wirkstoffanreicherung erreicht, die mit einer geringen systemischen Wirkung einhergeht. Folglich können unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden. Der Wirkeintritt ist zudem vergleichsweise schnell.^[43] Durch die lokale Wirkstoffanreicherung wird, verglichen mit alternativen Applikationsrouten, häufig eine höhere Therapieeffizienz erreicht. Das Broncholytikum, Salbutamol beispielsweise, erreicht bei oraler Gabe die gewünschte Dilatation der Atemmuskulatur der Lunge nach 2,5 - 3 h, wohingegen bei inhalativer Gabe diese bereits nach 10 - 15 min erreicht wird.^[44] Für die Behandlung einer akuten Atemnot im Rahmen der Asthmatherapie, bei der dieser Wirkstoff Anwendung findet, ist somit die topische Applikation von Salbutamol zu präferieren. Neben der lokalen Wirkstoffapplikation kann die Lunge auch als Portal für die systemische Pharmakotherapie genutzt werden. Aufgrund ihrer physiologischen Funktion, dem Gasaustausch mit der Umgebung, verfügt die Lunge insbesondere im Alveolar- und respiratorischen Bronchialbereich über eine äußerst große Resorptionsfläche. Diese große Resorptionsfläche verbunden mit der starken Vaskularisierung macht die Lunge zu einem attraktiven Ort für die Resorption von Wirkstoffen.^[43] Zudem ist die Anzahl an metabolischen Enzymen in der Lunge vergleichsweise gering.^[45] Bei der pulmonalen Applikationsroute wird darüber hinaus die Leber und damit einhergehend ein möglicher First-Pass-Effekt umgangen. Daher ist beispielsweise die Bioverfügbarkeit von Makromolekülen wie Peptide und Proteine bei pulmonaler Applikation wesentlich höher, als bei anderen nicht-invasiven Applikationsrouten.^[46] Der mit der

pulmonalen Applikation assoziierte schnelle Wirkeintritt kann auch für die Therapie systemischer Erkrankungen einen interessanten Aspekt darstellen. Inhalativ appliziertes Insulin ist hierfür ein geeignetes Beispiel.^[47] Aufgrund dessen wird das FDA-zugelassene inhalierbare Insulin Afrezza™ im Rahmen der Diabetestherapie als Mahlzeiteninsulin eingesetzt.^[48]

Dem Potential das die Lunge für die systemische und lokale Wirkstoffapplikation birgt, stehen jedoch diverse Hürden und Anforderungen gegenüber. Für eine erfolgreiche Inhalationstherapie ist die effiziente Deposition des Arzneistoffs in dem für die Therapie angestrebten Lungenabschnitt eine Kernvoraussetzung.^[1] Die Abscheidung der inhalierten Arzneistoffpartikel wird dabei von diversen Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen die Eigenschaften der inhalierten Partikel, die anatomische Geometrie des Respirationstraktes sowie das dort vorherrschende Luftströmungsprofil.^[49] Zudem spielen in diesem Kontext auch Anwendungsparameter, wie die Inhalationstechnik des Patienten, eine Rolle. Die wesentlichen Mechanismen, die für die Partikeldeposition im Respirationstrakt verantwortlich sind, stellen Impaktion, Sedimentation und Diffusion dar. Die Impaktion beschreibt die Abscheidung eines Partikels aufgrund von Trägheitskraft, wohingegen die Sedimentation die Abscheidung infolge der auf das Partikel wirkenden Gravitationskraft beschreibt. Ab einer Partikelgröße $< 1\mu\text{m}$ unterliegen die Partikel nicht mehr der Sedimentation sondern folgen der Brownschen Molekularbewegung. Ein derartiges Partikel scheidet sich durch ungerichtete Diffusion ab. Neben diesen, für Arzneistoffpartikel dominierenden Depositionsmechanismen, existieren noch die Interzeption und die elektrostatische Abscheidung. Ersteres ist für Partikel relevant, die in der Größenordnung des Atemwegdurchmessers liegen. Diese Form der Abscheidung ist daher eher für faserartige als für sphärische Partikel relevant.^[49, 50] Die drei dominanten Depositionsarten sind von der Partikelgröße abhängig. Die Partikelgröße steht zudem in Abhängigkeit zur Depositionswahrscheinlichkeit für bestimmte Lungenbereiche.^[51] In Abbildung 5 ist dieser Zusammenhang schematisch dargestellt. Bei der in der Graphik angegebenen Partikelgröße handelt es sich um den aerodynamischen Partikeldurchmesser d_{aero} . Dabei handelt sich um eine standardisierte Kenngröße mit Hilfe derer sich das aerodynamische Verhalten besser beschreiben lässt. So entspricht der aerodynamische Durchmesser eines Partikels dem Durchmesser, den ein sphärisches Partikel mit einer Dichte von 1 g/cm^3 hat, welches dasselbe Flugverhalten/ aerodynamische Verhalten zeigt, wie der zu untersuchende Partikel.^[52]

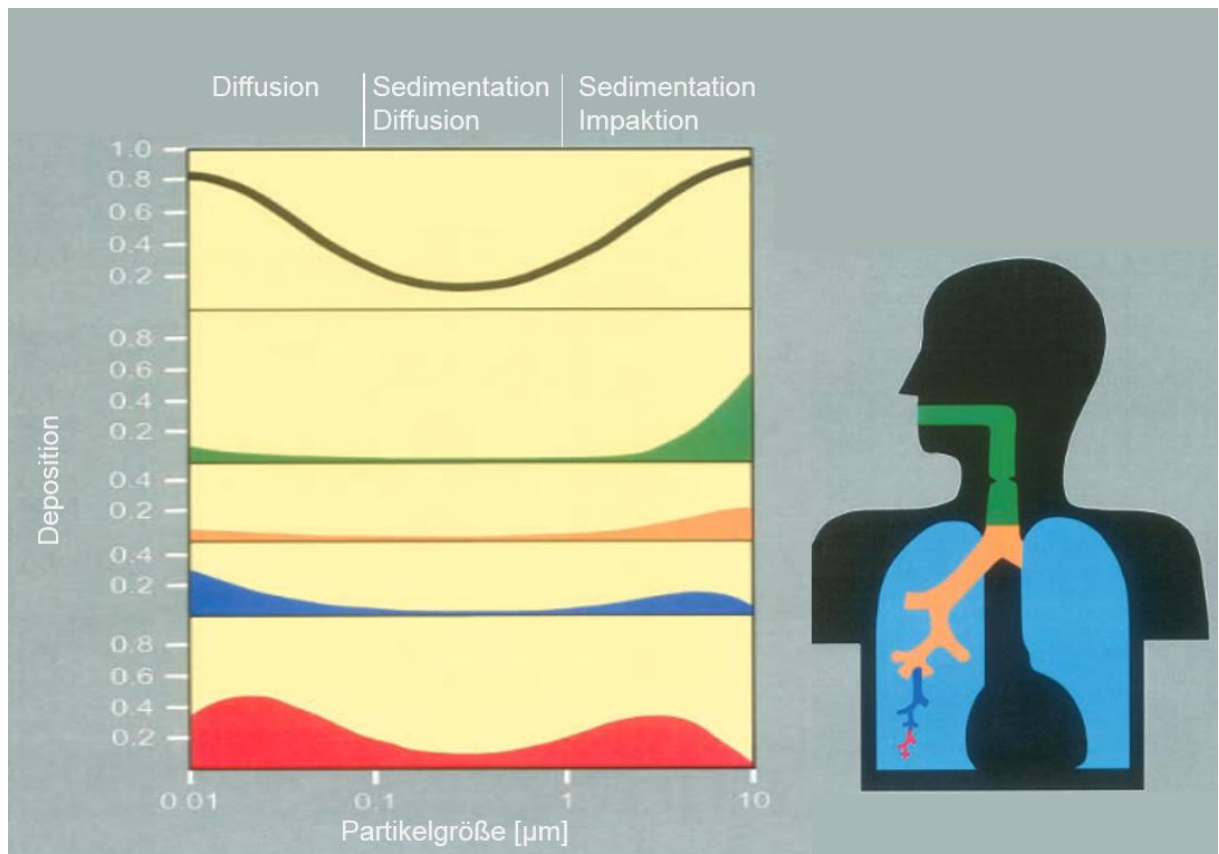


Abbildung 5: Darstellung der Depositionswahrscheinlichkeit und Depositionsart für die jeweiligen Lungenbereiche in Abhängigkeit der Partikelgröße, modifiziert nach Heyder, 2004 ^[51]. Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung der American Thoracic Society.

Basierend auf den Depositionsmechanismen und deren Größenabhängigkeit ergibt sich für den im Rahmen der inhalativen Therapie angestrebten Lungenabschnitt eine primäre Zielvorgabe, hinsichtlich der dort geforderten Partikelgröße. Um eine möglichst hohe Effizienz der Inhalationstherapie zu erreichen, müssen neben der Partikelgröße und Größenverteilung die anderen, bereits genannten, Einflussfaktoren mitberücksichtigt werden. Faktoren wie die richtige Inhalationstechnik oder die anatomische Gegebenheiten in der Lunge sind dafür gleichermaßen wichtig wie die Größe, Größenverteilung, Form oder Dichte der Partikel. Dies stellt sowohl an den Inhalator, als auch an die Formulierung, hohe Anforderungen.^[53] Ein die Formulierung betreffender Aspekt, der bis dato nur unzureichend gelöst ist, stellt die Umgehung der Reinigungsmechanismen der Lunge dar.^[54] Insbesondere Arzneistoffträgerpartikel, die sich zu langsam oder unzureichend auflösen, werden über diese Mechanismen, samt darin inkorporiert vorliegendem Wirkstoff, rasch aus der Lunge abtransportiert. Ein Aerosolpartikel muss sich erst lösen, bevor der Wirkstoff absorbiert werden kann.^[46] Erfolgt dies nicht, so bleibt die angestrebte Wirkung aus und die therapeutische Effizienz wird entsprechend erniedrigt. Diese Reinigungsmechanismen, insbesondere die mukoziliäre Clearance, stellt im Therapiemanagement von Lungenerkrankungen eine anzugehende Herausforderung dar.

1.2 Pulmonaler Wirkstofftransport

1.2.1 Moderne Wirkstoffträgersysteme für die pulmonale Applikation

Mit dem Ziel die Inhalationstherapie zur Behandlung systemischer oder lokaler Erkrankungen weiter zu optimieren, gewinnen neuartige Wirkstofftransport-basierte Strategien, zunehmend an Bedeutung. Ansatzpunkte die darüber adressiert werden sollen umfassen: Die Verbesserung der Permeabilität des Lungenepithels und somit der Bioverfügbarkeit bestimmter Wirkstoffe, die Möglichkeit einer Wirkstoffretention sowie kontrollierten Wirkstofffreisetzung, die Umgehung der Reinigungsmechanismen der Lunge, die Möglichkeit einer zielgerichteten Wirkstoffausbringung.^[20]

Besonders großes Potential in diesem Zusammenhang und daher intensiv beforscht, versprechen nanoskalige Trägersysteme (Drug Delivery Systeme), sogenannte Nanocarrier. Diese Bezeichnung umfasst Trägersysteme in einem Größenbereich von ca. 1 - 1000 nm.^[43, 54] Aus der Fülle existierender Nanocarrier gelten hinsichtlich ihrer Eignung als Wirkstoffträgersystem für die pulmonale Applikation besonders kolloidale Systeme auf Lipid- oder Polymerbasis als vielversprechend. Hierunter fallen Trägersysteme wie Liposome, Lipidnanopartikel oder Polymernanopartikel^[55] (siehe Abbildung 6).

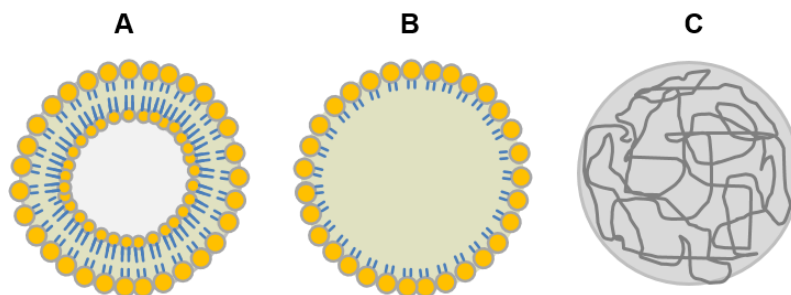


Abbildung 6: Schematische Darstellung von Liposomen (A), Lipidnanopartikel (B) und Polymernanopartikel (C).

Liposome sind aus Lipidmembranen geformte Vesikel, die eine wässrige Phase einschließen. Auf dieser Struktur basierend können sowohl hydrophobe als auch hydrophile Wirkstoffe darin eingebettet werden. Durch die Wirkstoffeinkapselung in Liposome kann z. B. eine Retention und eine langfristig, kontrollierte Wirkstoffabgabe erreicht werden. Dies konnte für das systemisch intendiert wirkende Insulin^[56] ebenso gezeigt werden, wie für Wirkstoffe die zur lokalen Behandlungen von Lungenerkrankungen eingesetzt werden.^[57] Die inhalative Antibiotikatherapie zur Behandlung von Pseudomonasinfektionen bei Patienten mit zystischer Fibrose ließe sich durch eine liposomale Formulierung womöglich ebenfalls verbessern. Durch die Möglichkeit der verzögerten Wirkstofffreisetzung ließe sich die Inhalationsfrequenz reduzieren und die Patientencompliance steigern.^[58] Ein weiteres, in diesem Kontext, intensiv beforschtes lipidbasiertes Trägersystem stellen die sogenannten Lipidnanopartikel

(Solid Lipid Nanopartikel, SLN) dar. Die Matrix dieser Partikel stellen bei Körper- und Raumtemperatur feste Lipide oder Lipidmischungen dar. Aufgrund der festen Struktur ist der darin inkorporiert vorliegende Wirkstoff besser geschützt als bei den eher fragilen Liposomen. Darüber hinaus lässt sich die Wirkstofffreisetzung aus einer festen Matrix besser steuern. Diese feste, hydrophobe Matrixstruktur der SLN erlaubt im Gegensatz zu den Liposomen nur die Inkorporation hydrophober Wirkstoffe. Zudem besteht die Möglichkeit der Oberflächenmodifizierung, um ein gezieltes Targeting zu erreichen. Lactoferrin funktionalisierte SLN könnten beispielsweise gezielt für das Targeting des Bronchialepithel eingesetzt werden. Das an der Oberfläche gekoppelte Lactoferrin agiert hier als Ligand für einen am Bronchialepithel überexprimierten Lactoferrin-Rezeptor.^[59, 60] Darüber ließe sich der Carrier lokal anreichern und darüber die Therapieeffizienz bei Lungenerkrankungen steigern. Für den zur Behandlung von Tuberkulose eingesetzte Wirkstoff Rifampicin konnten unter Verwendung dieses Trägersystems *in-vitro* eine höhere Wirkstoffkonzentration am eigentlichen Wirkort nachgewiesen werden.^[60]

Neben Lipid-basierten Trägersystemen werden zur Verbesserung der pulmonalen Wirkstoffapplikation auch Nanocarrier auf Polymerbasis intensiv beforscht. Die Nutzung von Polymeren als Trägermaterial ist dahingegen vorteilhaft, als dass aufgrund ihrer recht einfachen Designbarkeit sowie Modifizierungs- und Funktionalisierungsmöglichkeit eine hohe Anpassungsfähigkeit an spezifische Anforderungen besteht. Darüber hinaus zeichnen diese Trägersysteme eine vergleichsweise hohe Stabilität und gute Einstellbarkeit physikochemischer Eigenschaften, wie beispielsweise der Größe, aus. Basis dieser Trägersysteme können sowohl synthetische, als auch natürliche Polymere sein.^[54, 61, 62] Ist ein Einsatz als Wirkstoffträgersystem intendiert, sollte das Polymer die Kriterien Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit erfüllen. Polymere, die diesen Anforderungen entsprechen und bezüglich einer pulmonalen Applikation beforscht werden, umfassen z. B. die natürlichen Polymere Chitosan, Alginat, sowie die synthetischen Polymere Polymilchsäure (PLA) und Polylactid-co-Glycolid (PLGA).^[61, 62] Die chemische Diversität, der in diesem Kontext beforschten Polymere, ermöglicht es Trägersysteme sowohl für hydrophile, als auch für hydrophobe Wirkstoffe zu generieren. Aufgrund dessen und bedingt durch die genannten Vorzüge gegenüber anderen Nanocarriern, unterliegen polymere Nanopartikel einer Vielzahl an Forschungsbemühungen, die auf eine Effizienzsteigerung der pulmonalen Wirkstofftherapie abzielen. Dabei werden lokale Erkrankungen der Lunge ebenso adressiert wie Systemerkrankungen.^[63] Dies umfasst auch neuartige Therapieansätze, wie beispielsweise die Gentherapie für bestimmte Formen von Lungenkrebs. Dabei gelten polymer Nanopartikel als äußerst vielversprechendes Vehikel, um entsprechende Gene in Tumorzellen einzuschleusen und darüber die Tumorzelle letztlich zu zerstören.^[64]

Bezugnehmend auf den im vorherigen Kapitel 1.1.3 beschriebenen Zusammenhang zwischen pulmonaler Deposition und Partikelgröße müssen die hier vorgestellten Nanocarrier für eine ausreichende Lungendeposition in einem Größenbereich von 20 nm liegen. Sofern sie diese

Größe übersteigen müssen sie durch geeignete Methoden, wie z. B. die Sprühtrocknung, entweder in Mikropartikel umformuliert werden, oder bei der Applikation in einer geeigneten Flüssigkeit aerosolisiert werden. Dadurch lässt sich das zweite Maximum der im Bereich zwischen 1 - 5 μm erreichen und eine Exhalation dieser Trägersysteme umgehen (vgl. Abbildung 5).

1.2.2 Aktuelle Überwindungsansätze der Mukusbarriere

Für eine effiziente pulmonale Wirkstoffapplikation ist nach erfolgreicher Deposition im Tracheobronchialbereich die Mukusbarriere, die erste zu überwindende Hürde. Das unterliegende Epithelium kann nur nach Passage dieser nicht-zellulären Barriere erreicht werden. Da die Lunge, als Applikationsort für lokale und systemische Therapien zunehmend an Bedeutung gewinnt, rückt damit einhergehend die Überwindung der Mukusbarriere in den Fokus. Im Folgenden sollen derzeit beforschte Ansätze diese Barriere zu überwinden vorgestellt werden.

Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale und insbesondere zystische Fibrose sind mit äußerst viskosem Mukus und damit einhergehend einer stark beeinträchtigten mukoziliären Clearance assoziiert. Daher kommt es in Folge dieser Erkrankungen häufig zu bakteriellen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staphylococcus aureus*.^[33] Behandlungsleitlinien empfehlen vor der eigentlichen Antibiotikagabe den Einsatz mukolytisch bzw. mukoaktiver Substanzen. Dadurch soll die Viskosität des Mukus erniedrigt und die Effizienz der Antibiotikatherapie gesteigert werden.^[65] Die Viskositätserniedrigung besteht bei klassischen Mukolytika darin, die Disulfidbrücken des muzinbasierten Polymernetzwerks zu spalten.^[66] In diesem Kontext wird beispielsweise N-Acetylcystein (NAC) oder das davon abgeleitete Lysinsalz Nacystelyn (NAL) in inhalativer Form eingesetzt.^[67-69] Neue Forschungsansätze zum verbesserten Wirkstofftransport durch die Mukusbarriere nutzen derartige Substanzen gezielt. Ein Beispiel dafür sind inhalierbare Mikropartikel bestehend aus dem Antibiotikum Clarithromycin und dem mukolytisch wirkenden NAC. Dieses Wirkstoffträgersystem könnte zukünftig zur effektiven Behandlung von *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen im Rahmen von zystischer Fibrose Anwendung finden.^[70] Wirkstoffträgersysteme mit mukolytischer Aktivität werden auch im Nanomaßstab intensiv beforscht. Thiolierete selbstemulgierende Wirkstoffträgersysteme (self-emulsifying drug delivery systems, SEDDS) mit einer Größe von ca. 50 nm sind dafür ein geeignetes Beispiel. Die Thiolierung bewirkt eine deutliche Verbesserung der Mukuspenetration dieser Systeme.^[71] Nanocarrier, die mit mukolytischen Enzymen funktionalisiert sind, stellen ein weiteres Beispiel in diesem Kontext dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Oberflächenmodifizierung von Nanopartikel auf Polyacrylsäurebasis mit dem Enzym Papain in einer Verbesserung der Mukuspenetration resultiert.^[72] Diese Penetrationsverbesserung konnte auch für Nanopartikel auf PLGA-Basis, die an ihrer Oberfläche mit Papain, Trypsin oder Bromelain modifiziert sind, gefunden werden.^[73] Die Funktionalisierung von Nanopartikel mit Carboxylgruppen stellt wahrscheinlich eine weitere Möglichkeit dar, Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften von Mukus zu nehmen, um darüber den

Mukustransport des Trägersystems zu verbessern. Es wird postuliert, dass die beobachtete Penetrationsverbesserung auf eine durch die Carboxylgruppe induzierte Hydrierung des Muzinnetzwerks zurückzuführen ist.^[74] Die Oberflächenmodifikation von potentiellen Wirkstoffträgersystemen als solches, ist einer der Hauptansätze zur Überwindung der Mukusbarriere. Neben dem Aspekt der Beeinflussung der rheologischen Eigenschaften, wird sie jedoch primär genutzt, um die Interaktion des Trägersystems mit Muzinen zu unterbinden. Die hydrophile und ungeladene Beschaffenheit der Oberfläche sind Charakteristika, die eine Mukuspenetration möglicherweise begünstigen.^[75] Die PEGylierung ist als eine effiziente Möglichkeit zur Penetrationsverbesserung und Verhinderung der Mukoadhäsion des Trägersystems beschrieben. Zahlreiche Forschungsarbeiten beschreiben Wirkstoffträgerpartikel, die aufgrund der Funktionalisierung mit PEG den Mukus penetrieren können.^[76-78] Die Oberflächenmodifizierung mit Poloxamer, einem Ethylenoxid-Propylenoxid-Blockcopolymer, resultiert ebenfalls in Partikel, die eine gesteigerte Mukuspenetration aufweisen.^[79, 80] Eine weitere Einflusswirkung auf die Überwindbarkeit der Mukusbarriere wurde für die Größe des Trägersystems beobachtet.^[81] Einer Studie mit carboxylierten Polystyrolpartikel zeigte, dass 500 nm große Partikel in Mukus hinsichtlich ihrer Mobilität vollständig eingeschränkt waren, wohingegen 100 nm und 200 nm große Partikel ungehindert diffundieren konnten.^[82] Ein derartiger siebartiger Effekt konnte auch in zervikalem Mukus gefunden werden. Partikel, die eine Größe von 500 nm überstiegen konnten die Mukusbarriere nicht passieren.^[83] Zurückführen lässt sich dieser größenabhängige Penetrationseffekt vermutlich auf die heterogene, netzartige Struktur von Mukus.^[41, 42] In diesem Zusammenhang wird für biologische Hydrogele, wie Mukus, aufgrund der unterschiedlichen Maschenweite dieser Gele ein Siebeffekt angenommen.^[81] Resümierend lässt sich festhalten, dass die Interaktion des Wirkstoffträgersystems mit der Mukusmatrix sowie dessen Größe vermutlich die wesentlichen penetrationsbestimmenden Faktoren sind. Technologische Ansätze diese Barriere zu überwinden bestehen entweder darin, sich diese beiden Faktoren zu Nutze zu machen, oder die rheologischen Eigenschaften diese Barriere entsprechend zu verändern. Ein Überblick der derzeit verfolgten Ansätze ist zusammenfassend und schematisch in Abbildung 7 gezeigt.

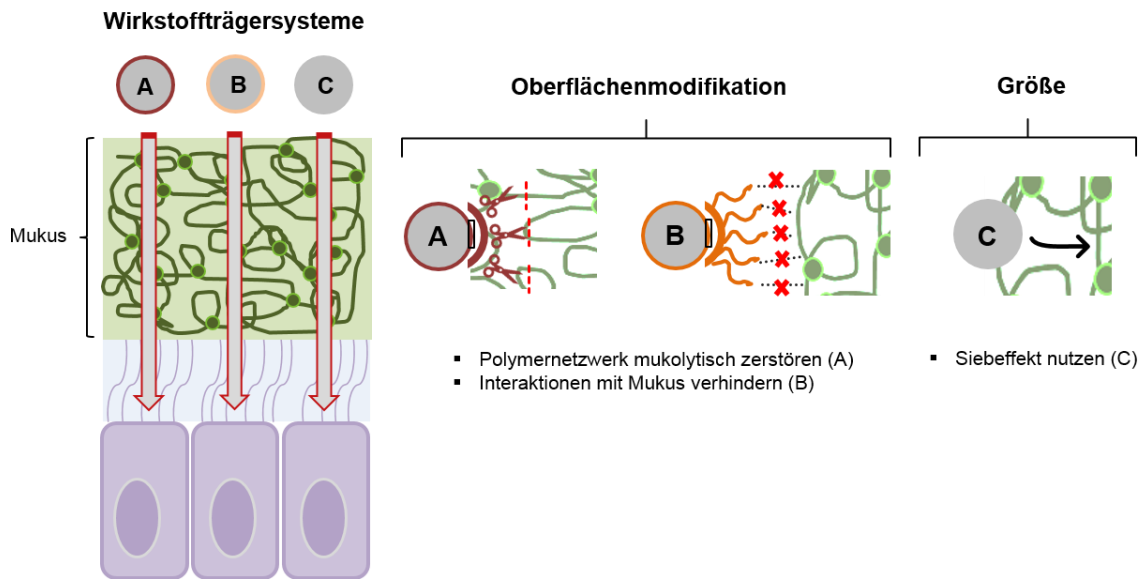


Abbildung 7: Schematische Darstellung derzeit verfolgter technologischer Ansätze zur Überwindung der Mukusbarriere. Dargestellt sind Wirkstoffträgersysteme, die aufgrund entsprechender Oberflächenmodifikation und/oder Größe die Mukusbarriere zu überwinden vermögen. Die Funktionalisierung der Oberfläche beabsichtigt entweder das mucusbasierte Polymernetzwerk mukolytisch zu zerstören (A) oder die Interaktion des Trägersystems mit den Muzinen zu unterbinden (B). Darüber soll letztlich die Penetration des Trägersystems ermöglicht werden. Ein weiterer Ansatz besteht darin, den für Mucus beschriebene Siebeffekt aufgrund des heterogenen Netzwerks auszunutzen und über die Größe des Trägersystems dessen Penetrationsfähigkeit zu gewährleisten.

1.3 Magnetische Nanopartikel

1.3.1 Magnetische Nanopartikel: Begriffsklärungen und Eigenschaften

Die Begrifflichkeit „Magnetische Nanopartikel“ umfasst nanoskalige Partikel, die eine Reaktion auf ein äußeres angelegtes Magnetfeld zeigen. Derartige Partikel gewinnen in den unterschiedlichsten Forschungs- und Anwendungsbereichen zunehmend an Bedeutung. Insbesondere im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen liegt der Forschungsschwerpunkt auf sogenannten superparamagnetischen Nanopartikeln.^[84]

Im Folgenden werden die wesentlichen theoretischen Grundlagen und Begriffe vorgestellt, die im Zusammenhang mit magnetischen Nanopartikeln, für das weitere Verständnis dieser Arbeit essentiell sind. Eine ausführliche Beschreibung hierzu findet sich in entsprechender Fachliteratur wie z. B. ^[85-87].

Kurzworstellung der Magnetismusarten

Die Magnetisierbarkeit eines magnetischen Materials, welches einem externen magnetischen Feld (H) ausgesetzt wird, ist über die sogenannte magnetische Suszeptibilität (χ) angegeben. Dieser Zusammenhang ist in der untenstehenden Formel verdeutlicht:

$$M = \chi H$$

Die Magnetisierung (M) ist dabei als magnetisches Moment pro Volumeneinheit definiert. Das magnetische Moment eines Atoms resultiert vorwiegend aus dem Spin der Elektronen (Spinmoment) sowie deren Bewegung um den Kern (Bahnmoment). Der Spin des Kerns selbst trägt in einem wesentlich geringeren Maße zum magnetischen Gesamtmoment bei. Demnach ergeben sich materialabhängig unterschiedliche Magnetisierungsverhalten. Man unterscheidet grundlegend Dia-, Para-, Ferro-, Ferri und Antiferromagnetismus.

Bei diamagnetischen Stoffen ist die Magnetisierung dem externen Magnetfeld entgegengerichtet, indiziert durch eine negative Suszeptibilität. Im Fall eines paramagnetischen Stoffes ist die Magnetisierung dem externen Feld hingegen proportional gleichgerichtet, was durch eine positive Suszeptibilität charakterisiert ist. Ebenfalls positiv, jedoch deutlich höher, ist die Suszeptibilität bei ferromagnetischen Stoffen. Die resultierende Magnetisierung ist bei diesen Stoffen nicht mehr proportional zur Feldstärke. Es kommt bei derartigen Materialien zu einer deutlichen Verstärkung des Magnetfeldes. Zurückführen lassen sich diese Effekte auf das Vorhandensein bestimmter geordneter Bereiche innerhalb dieser Materialien, den Weiß'schen Bezirken. In diesen Domänen liegen die Elektronenspins bei ferromagnetischen Materialien parallel ausgerichtet vor. Durch sogenannte Blochwände sind die einzelnen Bezirke voneinander getrennt. Aufgrund der unterschiedlichen Magnetisierungsrichtung dieser Domänen heben sich die magnetischen Kräfte auf. Eingbracht in ein Magnetfeld richten sich die Spins aller Domänen jedoch kollektiv in Richtung des angelegten Feldes aus und verstärken dieses (siehe Abbildung 8). Dieser Prozess lässt sich über die Feldstärke beeinflussen. Ist jedoch die vollständige Ausrichtung aller Domänen erreicht kann auch eine Erhöhung der Feldstärke die Magnetisierung nicht weiter maximieren. Entsprechend wird dieser Punkt als Sättigungsmagnetisierung (M_s) bezeichnet. Ein weiteres Charakteristikum ferromagnetischer Materialien ist der Verbleib einer Restmagnetisierung (M_r), auch Remanenz genannt. Nach Abschalten des Feldes behält ein Teil der Weiß'schen Bezirke die kollektive Ausrichtung bei, wodurch sich diese Remanenz begründet. Die Zurücksetzung der Magnetisierung auf ihren Ursprungswert null wird nur erreicht, wenn man ein entgegengesetztes Feld anlegt. Die Feldstärke bei der darüber die Ursprungsmagnetisierung erreicht wird, bezeichnet man als Koerzitivfeldstärke. Die Magnetisierung ferromagnetischer Materialien zeigt demnach Hystereseverhalten (vgl. Abbildung 8).

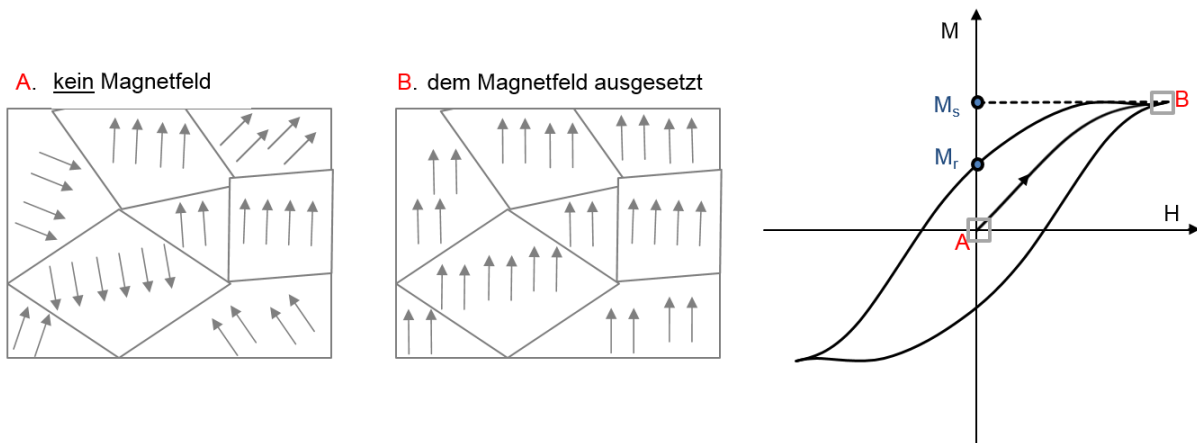


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Weiß'schen Bezirke ohne und mit Magnetfeldexposition (A bzw. B) sowie des Magnetisierungsverhaltens eines ferromagnetischen Materials (rechts). Die Magnetisierung eines derartigen Stoffes ist durch ein Hystereseverhalten charakterisiert. Demnach nimmt die Magnetisierung des Materials bei Anlegung eines Magnetfeldes solange zu, bis sich die Spins aller Domänen kollektiv in Richtung des angelegten Feldes ausgerichtet haben ($\hat{=}$ B). Dieser Punkt wird als Sättigungsmagnetisierung bezeichnet (M_s). Nach Abschalten des Feldes bleibt eine gewisse Restmagnetisierung (M_r) im ferromagnetischen Material vorhanden.

Darüber hinaus ist das Magnetisierungsverhalten derartiger Materialien temperaturabhängig. Wird die sogenannte materialabhängige Curie Temperatur überschritten, geht die parallele Anordnung verloren und es resultiert ein Übergang vom ferromagnetischen zum paramagnetischen Verhalten. Ferri- und antiferromagnetische Materialien sind aufgrund ihrer speziellen Kristallstruktur durch Weiß'sche Bezirke charakterisiert, in denen sich die magnetischen Momente nicht parallel, sondern antiparallel ausrichten. Bei den antiferromagnetischen Stoffen sind die Kräfte dieser Momente, im Gegensatz zu ferrimagnetischen Materialien, gleich groß sodass eine vollständige Auslöschung resultiert.

Superparamagnetismus und Induktives Heizen

Superparamagnetismus ist eine besondere Form von Magnetismus, der bei sonst ferro- und ferrimagnetischen Materialien unterhalb einer kritischen, materialabhängigen Größe auftritt. Diese kritische Partikelgröße entspricht der Dimension einer einzelnen Weiß'schen Domäne des Bulkmaterials. Im Größenbereich einer Einzeldomäne kann ein Partikel ein von seinem ferro- oder ferrimagnetischen Bulkmaterial verschiedenes Magnetisierungsverhalten aufweisen. Man spricht von superparamagnetischem Verhalten. Ab einer bestimmten Teilchengröße ist die zur Ummagnetisierung aufzuwendende Energie so gering, dass die Magnetisierungsrichtung des Partikels im magnetfeldfreien Zustand spontan fluktuiert. Die zur Ummagnetisierung notwendige magnetische Anisotropieenergie ist demnach geringer als die thermische Energie. Dieser Umstand ist kennzeichnend für Superparamagnetismus. Damit besitzen superparamagnetische Partikel, wie Paramagneten, keine fixe Ausrichtung der Magnetisierungsrichtung. Die Magnetisierungskurve bei Magnetfeldexposition ist durch einen sigmoidalen Verlauf charakterisiert (vgl. Abbildung 9). Derartige Partikel weisen eine

Sättigungsmagnetsierung auf, ihre Magnetisierung ist jedoch vollständig reversibel. Demnach zeigen diese Partikel nach der Magnetfeldexposition keine Restmagnetisierung und somit auch keine Hysterese.^[87-89]

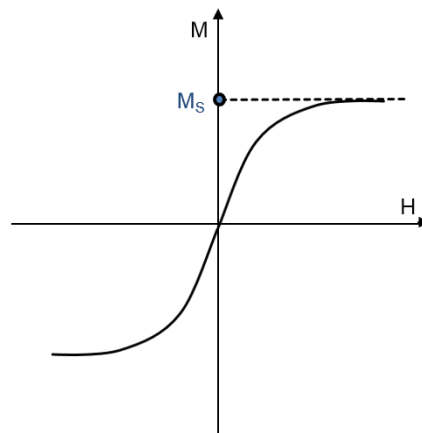


Abbildung 9: Magnetisierungskurve von superparamagnetischen Partikeln. Im Rahmen der Magnetfeldexposition eines solchen Partikels ergibt sich der für den Superparamagnetismus charakteristische sigmoidale Kurvenverlauf. Demnach erfährt ein solches Partikel eine Sättigung der Magnetisierung. Eine Restmagnetisierung oder Hysterese ist im Gegensatz zu seinem ferro- oder ferrimagnetischen Bulkmaterial jedoch nicht feststellbar.

Werden superparamagnetische Partikel einem hochfrequenten, alternierenden Magnetfeld ausgesetzt kommt es zur Wärmegenerierung. Dies wird im Rahmen des sogenannten induktiven Heizens solcher Partikel gezielt genutzt. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Wärmegenerierung stellen bei superparamagnetischen Partikeln zwei mögliche Relaxationsprozesse dar. Die Néel-Relaxation und die Brown-Relaxation. Beide Mechanismen sind in Abbildung 10 graphisch gegenübergestellt und sollen im Folgenden kurz dargelegt werden. Die Exposition gegenüber einem Wechselfeld führt dazu, dass die magnetischen Momente der Partikel versuchen der wechselnden Feldausrichtung zu folgen. Beim Übergang in den Gleichgewichtszustand wird infolge der Néel-Relaxation Energie in Form von Wärme abgeführt (vgl. Abbildung 10A). Darüber hinaus kann das alternierende Magnetfeld zur Gesamtrotaion des Partikels führen. Liegt der Partikel suspendiert in einer Flüssigkeit vor, wird infolgedessen Reibungswärme freigesetzt. Dabei induziert das Wechselfeld ein Drehmoment auf das magnetische Moment des Partikels, was letztlich dessen Rotation bedingt. Diese Rotation wird als Brownsche Rotation bezeichnet (vgl. Abbildung 10B).^[90, 91]

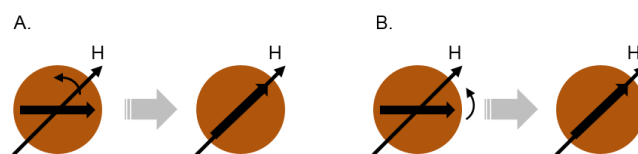


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Néel-Relaxation (A) und Brown-Relaxation (B) in Anlehnung an Schmidt 2007^[92]. Die Exposition gegenüber einem Wechselfeld resultiert bei superparamagnetischen Partikeln in der Rotation der magnetischen Momente (A) sowie der Rotation des gesamten Partikel (B). Beide „Rotationen“ haben die Freisetzung von Wärme zur Folge.

Die Zeitkonstanten der beiden Mechanismen (τ_N = Néelsche Relaxationszeit; τ_B = Brownsche Relaxationszeit) sind folgendermaßen definiert ^[93] :

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \qquad \tau_B = \frac{3\eta V_h}{k_B T}$$

mit:	k_B : Boltzmannkonstante	η : dynamische Viskosität des Mediums
	K : effektive Anisotropiekonstante	V_h : hydrodynamisches Volumen
	V : Partikelvolumen	τ_0 : Versuchszeit (materialabhängig)
	T : absolute Temperatur	

Beide Mechanismen finden parallel statt, wobei der Prozess mit der kürzeren Relaxationszeit entsprechend dominiert.

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B}$$

Im Falle suspendiert vorliegender Partikel herrscht bei größeren Partikel im Allgemeinen eher der Brownsche Mechanismus und bei kleineren Partikeln eher der Néel-Mechanismus vor. ^[92]

Da beide Relaxationsprozesse in direktem Zusammenhang mit der Wärmegenerierung superparamagnetischer Nanopartikel im hochfrequenten alternierenden Magnetfeld stehen, wird deutlich, von wie vielen Parametern diese abhängt. In einer Theorie von Rosensweig wird das komplexe physikalische Verhalten superparamagnetischer Partikel in Folge einer derartigen Magnetfeldexposition beschrieben. ^[94] Die detaillierte Ausführung dieser Theorie würde an dieser Stelle zu weit führen. Rosensweigs physikalische Beschreibung impliziert, dass die Wärmegenerierung neben den Feldparametern, Magnetfeldstärke und Frequenz, durch diverse Parameter, wie z. B. Partikelgröße oder der Viskosität des umgebenden Mediums, beeinflusst und optimiert werden kann.

1.3.2 Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Magnetit im Fokus

Nanopartikel, die einen Eisenoxidkern aufweisen und superparamagnetisches Verhalten zeigen, werden als superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (engl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) bezeichnet. Aufgrund der unterschiedlichen Modifikationen von Eisenoxid umfasst dies Nanopartikel mit einem Kern aus Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), Magnetit (Fe_3O_4) und Hämatit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Auch Mischungen dieser Kerne mit beispielsweise Kupfer, Kobalt und Mangan werden, sofern sie das entsprechende Verhalten aufweisen, prinzipiell

dieser Definition zugeordnet.^[95] Im Folgenden wird nur auf die reinen Eisenoxidpartikel eingegangen und aufgrund seiner Bedeutung für diese Arbeit auf Magnetit im Speziellen. Bei Magnetit handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Oxidmineral, dass Eisen der Oxidationsstufe II und III enthält, weshalb es auch als Eisen(II, III)-oxid bezeichnet wird. Die Kristallstruktur und der Aufbau der Einheitszelle sind in Abbildung 11 detailliert gezeigt. Das ferrimagnetische Mineral kristallisiert kubisch in der sogenannten inversen Spinell-Struktur. Insgesamt 32 Oxidionen bilden dabei die dichteste Kugelpackung. Die acht tetraedrischen und 16 oktaedrischen Gitterlücken werden, gemäß der unten gezeigten Abbildung 11, durch Eisen (II) und Eisen (III)-Ionen besetzt.^[96, 97]

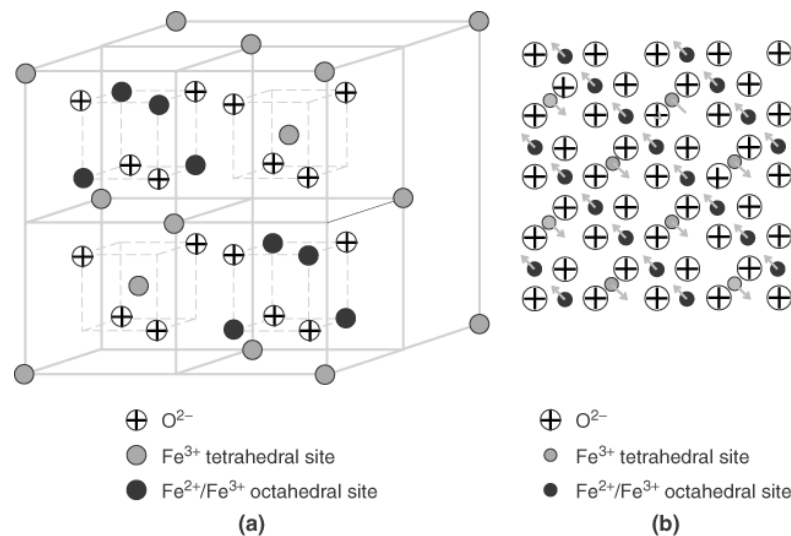


Abbildung 11: Darstellung der Kristallstruktur bzw. Einheitszelle von Magnetit (a). Die tetraedrischen und oktaedrischen Lücken werden durch Eisenionen, der gezeigten Legende entsprechend, besetzt. Basierend auf dieser Anordnung kommt es zur Ausbildung zweier Untergitter (b). Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung des John Wiley & Sons Verlags, Gossuin et al. 2009^[97].

Für Nanopartikel auf Magnetit-Basis ist ab einer Größe von ca. 20-30 nm ein Übergang vom ferromagnetischen zum superparamagnetischen Verhalten beschrieben.^[98] Partikel, die diesen Schwellenwert unterschreiten, bestehen demnach aus einer einzelnen Domäne und weisen keine Hysterese auf. Nach Entfernen eines externen Magnetfeldes bleibt aufgrund dessen keine Restmagnetisierung zurück. Dies ist ein ausschlaggebendes Charakteristikum für den biomedizinischen Einsatz solcher Partikel. Dadurch wird eine magnetisch induzierte Aggregation umgangen, was eine potentielle *in vivo* Anwendung derartiger Partikel grundsätzlich begünstigt.^[99] Ein weiterer in diesem Kontext anzuführender Aspekt ist das gute Toxizitätsprofil dieser Partikel.^[100] Die Eisenoxidpartikel werden *in vivo* zu Eisen abgebaut und dem physiologischen Eisendepot zugeführt. Demnach sind diese Partikel bioabbaubar.^[99]

1.3.3 SPIONs im pharmazeutisch-medizinischen Anwendungskontext

Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel besitzen aufgrund ihrer speziellen magnetischen Eigenschaften ein breites Anwendungsspektrum im medizinisch-pharmazeutischen Bereich.^[101] In Kombination mit ihrer guten Oberflächenmodifizierbarkeit ergeben sich für SPIONs sowohl diagnostische als auch therapeutische Einsatzmöglichkeiten. Eine Übersicht potentieller Modifizierungsmöglichkeiten sowie Anwendungsfelder ist in Abbildung 12 gezeigt. Im Folgenden soll anhand dessen das Potential dieser Partikel für den medizinisch-pharmazeutischen Sektor deutlich gemacht werden.

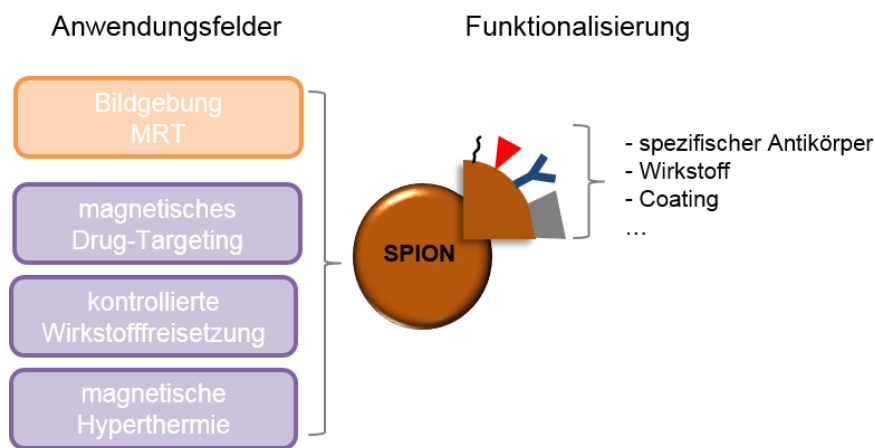


Abbildung 12: Darstellung der Anwendungsfelder und Funktionalisierungsmöglichkeiten von SPIONs im medizinisch-pharmazeutischen Kontext.

Im Hinblick auf das diagnostische Anwendungsfeld sind mit Dextran-gecoateten superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln bereits die ersten SPIONs zugelassen (z. B. Resovist[®], Feridex I.V.[®]). Diese SPIONs werden als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt. Die diagnostische Wirkung der angeführten leberspezifischen Kontrastmittel beruht darauf, dass diese Eisenoxidpartikel in der Leber von bestimmten, in gesundem Lebergewebe homogen verteilten, Zelltypen aufgenommen werden. Daraus resultiert eine selektive Kontrastierung. Die inkorporierten SPIONs führen aufgrund ihrer hohen T2/ T2*-Relaxivität zu einem Signalverlust in den entsprechenden Bereichen, sodass das gesunde Lebergewebe im MRT schwarz erscheint (Negativkontrastierung). Leberläsionen oder beispielsweise Lebermetastasen, die diese Partikel-inkorporierenden Zellen hingegen nicht oder in einer funktionsgestörten Form aufweisen, können darüber sichtbar gemacht werden.^[102] Die Entwicklung weiterer SPIONs für diagnostische Zwecke wird derzeit intensiv beforscht. Durch die Aufnahme in Makrophagen könnten SPIONs zukünftig zur bildlichen Darstellung von Infektionen und Entzündungen genutzt werden.^[103] Die große Oberfläche dieser Partikel bietet zudem vielfältige Funktionalisierungsmöglichkeiten. Ein Ansatz der darüber verfolgt wird ist die gezielte Ansteuerung von Tumoren, um diese am MRT besser lokalisieren zu

können.^[104, 105] Neben der medizinischen Bildgebung stellen SPIONs auch für andere pharmazeutisch-medizinische Anwendungen eine interessante Option dar. Hierzu zählt das Anwendungsfeld des gezielten Wirkstofftransports. Im Rahmen des sogenannten Magnetic-Drug-Targeting wird versucht über das Anlegen eines Magnetfeldes SPIONs an dem gewünschten Wirkort zu akkumulieren. Der entsprechende Wirkstoff ist hierzu meist durch Oberflächenmodifizierungen an die SPIONs gebunden. Ein Großteil der Forschungsbemühungen konzentriert sich in diesem Kontext auf die Krebstherapie. Diverse chemotherapeutische Wirkstoffe wurden bereits an SPIONs gekoppelt und über magnetische Felder erfolgreich im Tumorgewebe angereichert.^[106-108] Ein weiteres Anwendungsfeld der SPIONs ist die Stimulus-responsive Wirkstofffreisetzung. Möglich ist dies aufgrund ihrer Fähigkeit sich unter Anlegen eines hochfrequenten Wechsellmagnetfelds zu erwärmen. Eingebettet in ein entsprechendes Polymer oder Lipid, lässt sich ein zusätzlich inkorporierter Wirkstoff über diesen externen Stimulus freisetzen.^[109] Dies konnte bereits in zahlreichen Arbeiten für diverse Wirkstoffe gezeigt werden.^[110-112] Ein Ansatz der sich ebenfalls diesem externen Stimulus bedient ist die sogenannte magnetische Hyperthermie. Dabei handelt es sich um eine aussichtsreiche Therapieform zur Krebsbehandlung. Hierbei werden in das Tumorgewebe SPIONs injiziert, welche sich anschließend durch das Einbringen in ein hochfrequentes Wechsellmagnetfeld erhitzen. Dieses Übererwärmen des Tumorgewebes begünstigt letztlich dessen Zerstörung.^[113] Für bestimmte Hirntumore ist diese Art der Behandlung mit dem Produkt NanoTherm[®] und der entsprechenden NanoTherm[®] Therapie (MagForce AG) bereits zugelassen.^[114] Die hier angeführten Anwendungsbeispiele lassen das Potential der SPIONs für den medizinisch-pharmazeutischen Sektor erahnen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit und Vorgehensweise

Die Motivation dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines neuartigen Ansatzes zur Überwindung einer der wichtigsten nicht-zellulären Barriere bei der pulmonalen Wirkstoffapplikation – die Mukusbarriere. Dieser Barriere kommt eine äußerst wichtige physiologische Bedeutung zu. Inhalierte Fremdpartikel und Krankheitserreger bleiben an der viskosen Mukusschicht haften und werden über die Bewegung der unterliegenden Zilien im Rahmen der sogenannten mukoziliären Clearance abtransportiert. Diese Schutz- und Abwehrfunktion der Lunge macht jedoch andererseits eine effiziente Wirkstoffapplikation über diese Applikationsroute zu einer großen Herausforderung. Dies gilt nicht nur für die systemisch intendierte, sondern ebenso für lokoregionale Wirkstoffapplikationen in der Lunge. Im Falle der zystischen Fibrose ist diese Mukusschicht noch weitaus viskoser und somit noch schwere durchdringbar. Eine Pharmakotherapie von *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen bei ZF-Patienten ist aufgrund dessen beispielsweise stark limitiert.

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines speziellen Wirkstoffträgersystems, welches diese Mukusbarriere zu überwinden vermag. Der Ansatzpunkt hierfür stellt die Viskositätserniedrigung dieser äußerst viskosen Barriere dar und zwar induziert durch eine lokale Temperaturerhöhung. Ein völlig neuartiger Ansatz, der bislang in der Literatur nicht beschrieben ist.

Ein Trägersystem, dass sich infolge eines externen Stimulus erwärmt, bietet dafür die ideale Plattform. Vor diesem Hintergrund wurde die Entwicklung eines solchen Systems, bestehend aus dem Polymer Poly-lactid-co-Glycolid (PLGA) und darin inkorporiert vorliegenden superparamagnetischen Magnetit-NP, angestrebt. Beide Materialien sind biokompatibel und bioabbaubar und somit hoffnungsvolle Kandidaten für ein Wirkstoffträgersystem. Die Magnetit-NP stellen hierbei die Komponente dar, die auf den hier gewählten physikalischen Stimulus, ein hochfrequentes Wechsellmagnetfeld, reagiert. Setzt man die Kompositpartikel einem derartigen Feld aus, so sollte theoretisch eine Erwärmung dieser Partikel resultieren. Die induktiv generierte Partikelerwärmung erniedrigt, so die grundlegende Hypothese des hier vorgestellten Ansatzes, die Viskosität des den Kompositpartikel umgebenden Mukus lokal. Infolge der postulierten Viskositätserniedrigung ist das Trägersystem befähigt, die Mukusbarriere zu überwinden und den Transport von Wirkstoffen über diese Barriere hinweg zu ermöglichen.

Im Hinblick auf den in dieser Arbeit verfolgten neuartigen Ansatz zur Überwindung der Mukusbarriere, wurden verschiedene Zwischenschritte definiert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Teilaspekte sollen an dieser Stelle kurz vorgestellt werden:

- *Herstellung und Charakterisierung der magnetischen Nanokomposite*

Die Etablierung einer Methode mit der sich die für die Indikation angedachten magnetischen Kompositpartikel herstellen lassen, stellt den Ausgangspunkt dieser Arbeit dar. In diesem Zusammenhang wurde sich auf die Nanopräzipitation als Herstellungsmethode der Wahl festgelegt. Für die Protokolletablierung sollen Kompositpartikel unter Änderung verschiedener Parameter generiert und hinsichtlich Größe, Größenverteilung und Morphologie charakterisiert werden. Die Beladung mit Magnetit-NP sowie deren Inkorporationsverhalten in der Polymermatrix sind, ebenso wie die magnetischen Eigenschaften der Kompositpartikel, weitere wichtige Untersuchungsaspekte. Primäres Ziel ist die kontrollierte und reproduzierbare Herstellung von Kompositpartikeln, die sich unter dem angedachten Stimulus induktiv erwärmen lassen.

- *Induktives Heizen der magnetischen Nanokomposite*

Die Erwärmung der Kompositpartikel unter Anlegung eines hochfrequenten Magnetwechselfeldes ist die Grundvoraussetzung für die mit diesem Trägersystem beabsichtigte Weise die Mukusbarriere zu überwinden. Die Testung inwieweit die magnetischen Kompositpartikel dieses Kernkriterium erfüllen, ist daher von großer Bedeutung. Dafür gilt es ein entsprechendes Set-up zu entwickeln, welches neben dem induktiven Heizen der Partikel eine präzise Messung der generierten Wärme ermöglicht. Zudem sind mögliche Einflussparameter zu identifizieren und die optimalen Bedingungen für eine effiziente Erwärmung herauszuarbeiten.

- *Induktionserwärmung und Partikelmigrationsverhalten in Mukus*

Die Einflussuntersuchung der induktiven Erwärmung auf das Partikelmigrationsverhalten in Mukus stellt ein wesentlicher Schritt hinsichtlich des in dieser Arbeit verfolgten Ansatzes dar. Hierfür gilt es zunächst ein geeignetes Set-up zu entwickeln mit dessen Hilfe sich die Partikelpenetration in Mukus unter induktiven Heizbedingungen grundsätzlich untersuchen lässt. Die Etablierung dieses experimentellen Versuchsaufbaus wird in der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Verfügbarkeit von nativem Mukus zunächst anhand eines entsprechenden Modellgels erfolgen. Im Rahmen der Setup-Etablierung ist zudem ein erster grundsätzlicher Machbarkeitsnachweis des in dieser Arbeit postulierten Zusammenhangs zwischen applizierter Wärme und Partikelpenetrationsverhalten angedacht.

Darüber hinaus ist in dieser Arbeit die Entwicklung eines Wirkstoffträgersystems zur Behandlung chronischer Pseudomonasinfektionen bei ZF-Patienten intendiert. Als Wirkstoff soll in diesem Zusammenhang das Antibiotikum Ciprofloxacin in die magnetischen Kompositpartikel co-verkapselt werden. Die Wirkstofffreisetzung ist Stimulus responsiv über das Anlegen eines hochfrequenten Wechselmagnetfeldes beabsichtigt. Damit eröffnet dieses Trägersystem, aufgrund seiner theoretischen Erwärmbarkeit, eine völlig neuartige Behandlungsstrategie. Durch die hier postulierte, via Erwärmung induzierte, bessere Penetrierbarkeit, könnte das Trägersystem die im äußerst viskosen ZF-Mukus inkorporiert vorliegenden Erreger erreichen und diese durch die simultane Wirkstofffreisetzung effektiv bekämpfen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgeführt und entsprachen, sofern nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad für analytische Zwecke. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Wasser wurde durch Umkehrosmose gewonnen und mit der Reinstwasser-Aufbereitungsanlage Millipore Q-Gard[®]2 (Merck Millipore, Billerica, USA) aufgereinigt.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller/ Bezugsquelle
Aceton	VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Acetonitril	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hydroxyethylcellulose, Tylose H300NG4	SE Tylose GmbH & Co. KG, Wiesbaden
PLGA 50:50, Resomer RG 503 H	Evonik Industries AG, Darmstadt
Polyvinylalkohol	Kuraray Europe GmbH, Hattersheim
Triethylamin	Merck-Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Uranylacetat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Magnetit-NP

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung der magnetischen Nanokompositen verwendeten Magnetit-NP wurden von Qian Zhang (Doktorandin im AG Biophotonik, Philipps-Universität Marburg; Bezugsquelle 1) sowie Sandra Schäfer (Doktorandin am Institut für Anorganische Festkörperchemie, Universität des Saarlandes; Bezugsquelle 2) synthetisiert. Bei beiden Bezugsquellen wurden die ölsäurestabilisierte Magnetit-NP mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 10 nm nach dem Protokoll von Sun et al.^[115] synthetisiert. Im Rahmen der Synthese von Bezugsquelle 2 wurde 1,2-Hexadecanediol durch 1,2-Tetradecandiol ersetzt, die Partikel magnetisch abdekantiert statt zentrifugiert, 3x mit Ethanol gewaschen und anschließend (ohne Trocknen) in Chloroform überführt. Die Konzentration

der von beiden Bezugsquellen abgegebenen und in Chloroform redispergierten Magnetit-NP entspricht 20 mg/ml. Die Partikel wurden nach der Synthese jeweils von der entsprechenden Arbeitsgruppe hinsichtlich Größe und Größenverteilung mittels TEM bzw. DLS-Messungen geprüft bzw. charakterisiert. Eine schematische Darstellung sowie eine TEM-Aufnahme der von Bezugsquelle 1 und 2 synthetisierten Magnetit-NP findet sich in Abbildung 13.

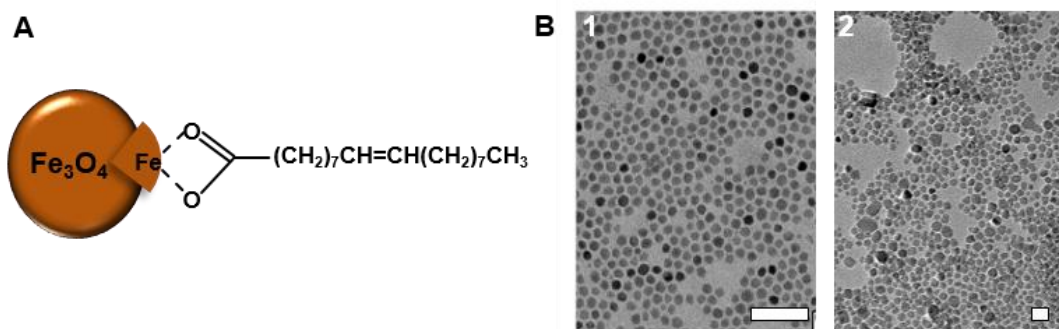


Abbildung 13: Schematische Darstellung (A) und TEM-Aufnahmen (B) der mit Ölsäure hydrophobisierten Magnetit-NP der Bezugsquelle 1 und 2. Der Maßstabsbalken in B-1 entspricht 60 nm, der Maßstabsbalken in B-2 entspricht 20 nm.

Ciprofloxacin

Der antibiotische Wirkstoff Ciprofloxacin (Cipro) sollte in der vorliegenden Arbeit in die magnetischen Nanokomposite inkorporiert werden. Hierzu wurde auf eine komplexierte Variante dieses Wirkstoffes zurückgegriffen. Bestandteil dieser Komplexverbindung ist neben Ciprofloxacin das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat (SDS). In einer vorangegangenen Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass diese Komplexbildung die Löslichkeit des Wirkstoffes erheblich verbessert, wodurch letztlich die Verkapselungseffizienz in PLGA-NP unter Verwendung der Nanopräzipitationsmethode gesteigert werden konnte.^[116, 117] Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit auf den komplexierten Wirkstoff zurückgegriffen. In der vorliegenden Arbeit ist unter der Bezeichnung Ciprofloxacin immer der Gegenionen-basierende Wirkstoffkomplex zu verstehen. Synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurde der Ciprofloxacin-SDS-Komplex von Nazende Günday Türeli (externe Doktorandin im AK Schneider, MJR Pharmjet GmbH). In Abbildung 14 ist die chemische Struktur dieses Komplexes dargestellt. Dessen Herstellung ist dem in Günday Türeli et al. beschriebenen Protokoll zu entnehmen.^[116]

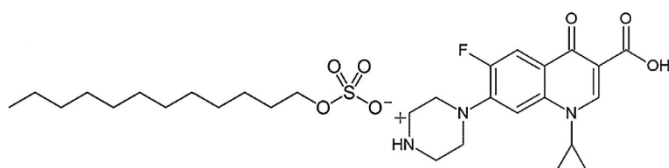


Abbildung 14: Strukturformel des Ciprofloxacin-SDS-Komplexes nach Günday Türeli et al., 2016^[117].

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In den beiden nachstehenden Tabellen sind die Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller/ Bezugsquelle
Analysewaage, SAR CP 225D	Sartorius AG, Göttingen
faseroptischen Temperatursensor, Sensortyp TS4	Optocon AG, Dresden
Gefriertrocknungsanlage, Alpha 2-4 LSC	Martin Christ GmbH, Osterode am Harz
Hochfrequenzgenerator IG 5/30000	Hüttinger Elektronik GmbH & Co. KG, Freiburg im Breisgau
HPLC Pumpe P 680, ASI-100 Automated Sample Injector, Detektor UVD340U	Dionex GmbH, Idstein
HR-CS AAS ContrAA 700- Graphitrohrmodus mit Flüssig-Probengeber MPE 60	Jena Analytik AG, Jena
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, LSM 710	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer, VWR VMS-D	VWR International GmbH, Darmstadt
Manuelle Pipette 5000 µl, 1000 µl, 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma, Serie 7500	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Ratingen
pH-Meter	Schott AG, Mainz
Photonenkorrelation-Spektrometer, Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK
Rasterelektronenmikroskop, Zeiss EVO HD15 SEM	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Rotationsverdampfer, Rotavapor R-205	Büchi Labortechnik GmbH, Essen
Temperaturmessgerät, Fototemp 1-4	Optocon AG, Dresden
Transmissionselektronenmikroskop, JOEL-JEM-2010	JEOL GmbH., Freising
Transmissionselektronenmikroskop, JOEL-JEM-2011	JEOL GmbH., Freising
Vibrating Sample Magnetometer, EV7	ADE Technologies, MicroSense LLC, Lowell, USA
Vortexer, Vortex-2-Genie	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wärmeschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Wasserimmersionsobjektiv Objektiv LDC-Apochromat 40x/1,10 W Korr M27	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Zentrifuge, Heraeus Multifuge X1R	Thermo Electron LED GmbH, Kalkberg

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/ Bezugsquelle
15-Kammer-Probenhalter, 15 μ -Slide Angionese	ibidi GmbH, Martinsried
Einmalkanüle, 0,55 x 25 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritze, 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegküvette, 1 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
HPLC-Säule, LiChroCART 125-4 LiChrospher 100 RP-18e (5 μ m)	Merck KGaA, Darmstadt
HPLC-Vorsäule, LiChrospher 100 RP-18e (5 μ m)	Merck KGaA, Darmstadt
Leit-Tab	Plano GmbH, Wetzlar
Midi MACS Säule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Pipettenspitzen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß, 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Standard-Objekträger	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Stiftprobenteller	Plano GmbH, Wetzlar
TEM Kupfergrid, S160-3 Kohlefilm auf Kupfernetz 300 mesh	Plano GmbH, Wetzlar
Zentrifugenröhrchen, 15/ 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.3 Biologisches Material

Bei dem in dieser Arbeit verwendete Mukus handelt es sich um respiratorischen Pferdemukus. Dieser wurde im Rahmen einer Bronchoskopie an Pferden erhalten. Bezogen wurden die Mukusproben aus der Pferdeklinik Altforweiler (Überherrn-Altforweiler) im Rahmen einer Kooperation mit Frau Dr. med. Bianca Schwarz.

2.2 Charakterisierungsmethoden

In diesem Kapitel wird eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Charakterisierungsmethoden gegeben. Eine umfassende Charakterisierung der magnetischen Nanokomposite ist essentiell. Dies gilt sowohl zur Beurteilung der Effizienz des Herstellungsprozesses als auch zur Bewertung der Zielerreichung und Umsetzbarkeit der angedachten Applikation. Die theoretischen Grundlagen der hierfür herangezogenen Methoden sind in der Literatur ausführlich beschrieben. Daher wird an dieser Stelle nur eine Kurzdarstellung des jeweilig zugrundeliegenden Messprinzips gegeben.

2.2.1 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch als Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bezeichnet, ist eine Methode zur Größenbestimmung sehr kleiner Partikel. Das der Methode zugrunde liegende Messprinzip beruht auf der Streuung von Licht an kolloidalen Teilchen. Im Rahmen der Messung wird die Probe mit Laserlicht bestrahlt und die dabei resultierende Streulichtintensität, bzw. deren Schwankungen, detektiert. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung des Dispersionsmediums kommt es zur Diffusion der Partikel und somit zu zeitabhängigen Schwankungen dieser Streulichtintensität. Die Intensitätsschwankungen korrelieren demzufolge mit der Partikelgröße. Messtechnisch erfasst werden diese durch einen Photomultiplier. Aus den erhaltenen Messdaten wird eine Korrelationsfunktion generiert aus der die Diffusionskonstante D hervorgeht mit der sich letztlich, eingesetzt in die Stokes-Einstein-Gleichung, der mittlere hydrodynamische Partikeldurchmesser ermitteln lässt. Ausgegeben wird dieser als z-Average. Zudem wird bei jeder Messung eine Verteilungsbreite in Form des sogenannten Polydispersitätsindex (PDI) mit angegeben, der in der Praxis wie folgt bewertet wird: Ein PDI von 0 entspricht einer monodispersen Verteilung. PDI-Werte $< 0,200$ charakterisieren eine enge, Werte von $0,300 - 0,500$ eine breite und Werte ab $0,500$ eine sehr breite Partikelgrößenverteilung.^[118, 119]

Die PCS wurde zur Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Partikelsysteme herangezogen. Als Messgerät diente ein Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments. Hierzu wurden $50\ \mu\text{l}$ der Partikelsuspension mit $950\ \mu\text{l}$ Wasser verdünnt. Anschließend wurde die jeweilige Probe in das Gerät eingebracht und in einem Winkel von 173°C dreifach vermessen.

2.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ein hochauflösendes bildgebendes Verfahren, welches neben der Morphologie auch die Analyse der inneren Struktur eines Objektes ermöglicht. Die zu untersuchende Probe wird hierbei mit einem hochenergetischen Elektronenstrahl durchstrahlt und optisch abgebildet. Der Strahlengang ähnelt dabei dem eines gewöhnlichen Durchlichtmikroskops. Das zugrundeliegende Prinzip der Bildentstehung ist hingegen ein anderes. Als Strahlquelle dient hier eine Kathode. Die thermisch emittierten Elektronen werden durch das Anlegen einer hohen Spannung zur Anode hin beschleunigt, bevor die resultierende Strahlung durch ein Kondensorsystem gebündelt und auf das zu untersuchende Objekt fokussiert wird. Beim Durchgang des Elektronenstrahls kommt es zu Wechselwirkungen mit dem Objekt. Dabei durchdringen die Elektronen, je nach Position und Masendichte, das Objekt entweder ungehindert oder werden an den Atomen der Probe gestreut. Der ungebeugte Primärstrahl wird durch diverse Linsen vergrößert bevor am Leuchtschirm das Bild erzeugt bzw. dieses via CCD Kamera in ein digitales Bild umgewandelt wird. Die gestreute Strahlung wird hingegen durch die sogenannte Kontrastblende weitgehend

absorbiert und somit von der Bildentstehung größtenteils ausgeschlossen. Man spricht in diesem Fall, da nur die schwach streuenden Bereiche abgebildet werden, von einer Hellfeldaufnahme. Die stark streuenden Bereiche erscheinen hierin dunkel auf hellem Untergrund. Nutzt man zur Bilderzeugung durch Verschiebung dieser Blende hingegen ausschließlich die gebeugten Strahlen, resultiert eine sogenannte Dunkelfeldaufnahme. Eine detaillierte Herleitung der Bild- und Kontrastentstehung sowie tiefergehende physikalische und mathematische Grundlagen dieser Methode sind in entsprechender Fachliteratur zu finden.^[120]

In der vorliegenden Arbeit wurde das TEM routinemäßig zur Untersuchung der hergestellten magnetischen Kompositpartikel eingesetzt. Hauptaugenmerke lagen hierbei auf der Bestimmung von Partikelgröße, Partikelform und insbesondere auf der Anordnung der in den Kompositpartikel inkorporierten Magnetit-NP. Ferner wurden mittels TEM die reinen Magnetit-NP untersucht. Im Rahmen der Forschungstätigkeiten am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Philipps-Universität Marburg erfolgten die transmissionselektronischen Untersuchungen an einem JOEL-JEM-2010 der Firma Jeol (JEOL GmbH, Freising). Im Zuge der Fortführung der Doktorarbeit am Institut für Biopharmazie und Pharmazeutischen Technologie der Universität des Saarlandes wurden die entsprechenden TEM-Analysen an einem JOEL-JEM-2011 der Firma Jeol (JEOL GmbH, Freising) durchgeführt.

Die TEM-Untersuchung erfolgte an beiden Geräten ausschließlich im Hellfeldmodus. Im Rahmen der Probenpräparation wurden die magnetischen Kompositpartikel mit einer 2%igen Uranylacetatlösung kontrastiert. Ausschlaggebend hierfür ist die chemische Beschaffenheit der Polymermatrix der Kompositpartikel. Das verwendete Polymer PLGA besteht ausschließlich aus Elementen bzw. Atomen mit niedrigen Ordnungszahlen (O, C, H). Aufgrund dessen ist keine nennenswerte Streuung und folglich auch kein nennenswerter Kontrast im Rahmen einer transmissionselektronischen Untersuchung zu erwarten.

Um dennoch die Kompositpartikel mittels TEM abbilden zu können, wurde die sogenannte Negativkontrastierung unter Verwendung von Schwermetallen angestrebt. Dabei lagern sich die Metallionen beim Trocknen der Schwermetallsalzlösung um die Partikel herum ab. Unter dem Einwirken des Elektronenstrahls resultiert an diesen schweren Atomen eine starke Streuung und somit ein starker Kontrastunterschied. Der Partikel erscheint im Zuge dessen im negativen Kontrast, d. h. hell auf dunklem Untergrund.^[121]

Protokoll der Probenpräparation und Kontrastierung

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Protokoll zur Probenpräparation und Kontrastierung entwickelt und etabliert, welches an dieser Stelle kurz vorgestellt werden soll. In Abbildung 15B ist die hier etablierte Vorgehensweise schematisch dargestellt. Das dargestellte Protokoll umfasst folgende Schritte: In einem ersten Schritt (1) wird die Partikelsuspension auf den Probenträger aufgebracht. Als Probenträger diente ein sogenanntes TEM-Grid mit einem Durchmesser

von 3 mm. Dieses besteht aus einem Kupfernetz, das mit einem dünnen Trägerfilm aus Kohlenstoff beschichtet ist. Nach Probenauftrag folgt der Kontrastierungsschritt (2) bei dem das Grid mit der Probenseite zunächst 45 s in die 2%ige wässrige Uranylacetatlösung eintaucht und danach weitere 2 min einwirken gelassen wird. Daran schließt sich ein Waschschrift mit Wasser (3) an. Nach Absaugen der Flüssigkeit und Trocknen wird die so aufgebrachte und kontrastierte Probe in den Probenhalter eingespannt und transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. In Abbildung 15A ist darüber hinaus die generelle Notwendigkeit der Uranylacetat-Kontrastierung zur TEM-Untersuchung der hier hergestellten magnetischen Kompositpartikel gezeigt. In der linken TEM-Aufnahme sind partikuläre Objekte erkennbar, jedoch mit einem schlechten Kontrast. Eine detaillierte Betrachtung der Partikel ist unmöglich, da sie dem Elektronenstrahl ausgesetzt, unmittelbar zerlaufen. Die Kontrastierung erhöht nicht nur den Kontrast, sondern verleiht den Partikeln eine gewisse Stabilität gegen den Strahl.

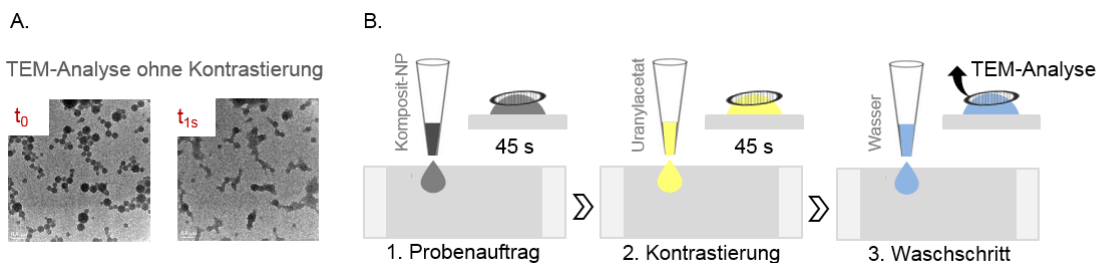


Abbildung 15: Darstellung der Notwendigkeit der Kontrastierung zur TEM-Untersuchung (A). Gezeigt sind TEM-Aufnahmen zum Zeitpunkt t_0 sowie 1 s nach der Betrachtung am TEM. Daraus geht hervor, dass die Partikel aufgrund des schwachen Kontrasts schwierig zu erkennen sind und aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber dem Elektronenstrahl bei der transelektronenmikroskopischen Betrachtung zerstört werden. Eine detaillierte Untersuchung ist demnach unmöglich. Durch die Kontrastierung wird dem entgegengewirkt. In B sind die einzelnen Schritte der etablierten Probenpräparation zur TEM-Untersuchung schematisch dargestellt.

2.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM), engl. Scanning Electron Microscopy (SEM), ist ein bildgebendes Verfahren zur Charakterisierung der Form und Oberflächenbeschaffenheit von Objekten. Im Gegensatz zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Elektronenmikroskopieart wird bei der REM die Probe nicht durchstrahlt, sondern die Probenoberfläche mit einem scharf fokussierten Elektronenstrahl zeilenweise abgetastet. Dieser sogenannte Primärstrahl erzeugt beim Auftreffen Wechselwirkungen mit dem Objekt. Infolgedessen werden u. a. Rückstreuielektronen sowie Sekundärelektronen emittiert. Beide genannten Elektronenarten können zur Bilderzeugung im REM genutzt werden. Meist wird jedoch in diesem Kontext auf die Sekundärelektronen zurückgegriffen. Hierzu wird der am jeweiligen Rasterpunkt detektierten Intensität an Sekundärelektronen eine Grauwertinformation zugeordnet und als Bildpunkt dargestellt. Nach diesem Prinzip, hier vereinfacht dargestellt, entsteht eine Punkt-für-Punkt Abbildung der Probenoberfläche. Eine ausführliche Darstellung der physikalischen und technischen Grundlagen der Rasterelektronenmikroskopie findet sich in der Literatur.^[122]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt um die hergestellten magnetischen Nanokomposite hinsichtlich Morphologie und Größe zu untersuchen. Die Probe wurde hierzu in Tropfenform auf ein Siliziumwaferstück aufgebracht, welches zuvor auf den REM-Probenhalter geklebt wurde. Nach Trocknung der Probe wurde diese anschließend in einer Kathodenzerstäubungsanlage bei 40 mA für 50 s mit einer 30 nm Goldschicht besputtert. Dadurch wird die Probe für die nachfolgende REM-Untersuchung elektrisch leitfähig gemacht. Nach erfolgtem Sputtern wurde die Probe in die Probenkammer des REM eingebracht und im Hochvakuum vermessen.

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten in dieser Arbeit an einem Zeiss EVO HD15 REM der Firma Zeiss (Carl Zeiss AG, Oberkochen). Die Kompositpartikel wurden hierzu aufgereinigt und verdünnt. Diese verdünnte Partikelsuspension wurde dann, wie oben beschrieben, auf den Wafer aufgebracht und entsprechend untersucht.

2.2.4 Vibrationsmagnetometer

Das Vibrationsmagnetometer, engl. Vibrating Sample Magnetometer (VSM), dient zur Messung magnetischer Eigenschaften. Genauer gesagt lässt sich damit das Magnetisierungsverhalten einer Probe näher untersuchen. Hierzu wird die zu charakterisierende Probe in ein Magnetfeld eingebracht. In diesem wird die Probe bei bekannter Frequenz in Vibration versetzt. Die dadurch resultierende Änderung der Probenmagnetisierung führt zu einem sich ändernden Fluss in der probennahen Aufnahmespule. Dies wiederum induziert eine messbare, sich zeitlich ändernde Spannung. Basierend auf der hervorgerufenen Induktionsspannung kann auf die Probenmagnetisierung rückgeschlossen werden, da sie zu dieser proportional ist. Eine detaillierte Beschreibung des Messprinzips und apparativen Aufbaus findet sich in der entsprechenden Fachliteratur.^[123]

Die VSM-Messungen wurden am Institut für Physikalische Chemie der Universität zu Köln von Frau Johanna Nothacker durchgeführt (Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Anette Schmidt). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das VSM zur magnetischen Charakterisierung der hergestellten magnetischen Kompositpartikel sowie der hierzu eingesetzten Magnetit-NP herangezogen. Primär sollten diese Messungen klären, inwieweit die hergestellten Kompositpartikel das postulierte superparamagnetische Verhalten aufweisen. Die zur Herstellung der Kompositpartikel genutzten Magnetit-NP wurden diesbezüglich ebenfalls untersucht. Die Proben wurden vor der Untersuchung gefriergetrocknet und vermessen. Für eine Messung wurden 9-15 mg eingewogen. Das Probenmaterial wurde hierzu in einen versiegelten Teflonbehälter überführt. Dieser wurde in den Probenraum zwischen den beiden Polen des Elektromagneten eingebracht und bei einer Frequenz von 75 Hz in Vibration versetzt. Die Magnetisierungskurven wurden unter Raumtemperaturbedingungen an einem Magnetics Vibrating Sample Magnetometer EV7 der Firma ADE Technologies (ADE Technologies, MicroSense LLC, Lowell, USA) mit einer maximalen Feldstärke bis zu 1600 kA m^{-1}

aufgenommen. Aus den erhaltenen Kurven wurden die nachfolgenden Parameter berechnet: Sättigungsmagnetisierung M_s , magnetischer Moment m , initiale Suszeptibilität χ_{ini} , Durchmesser des magnetischen Kerns sowie der magnetische Gehalt μ_{mag} der Probe.

2.2.5 Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie

Die Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie, engl. inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS), ist eine spektrometrische Methode der Elementaranalyse. Dabei wird die zu analysierende Probe zunächst aerosolisiert bevor sie mittels Plasma ionisiert wird. Dieses Plasma wird durch die Induktion eines hochfrequenten Stroms in einem Trägergas, meist Argon, erzeugt. Die im Rahmen des Ionisierungsprozess entstehenden Probenionen werden anschließend unter Verwendung eines Massenspektrometers nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (M/z) getrennt und detektiert. Eine ausführliche Beschreibung dieser Analyse-methode findet sich in der Fachliteratur.^[124]

Die ICP-MS Messungen wurden im AG Biophotonik, Fachbereich Physik an der Philipps-Universität Marburg von Herrn Karsten Kantner (Doktorand in der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Wolfgang Parak), durchgeführt. Die Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zur Eisenbestimmung herangezogen. Darüber sollte letztlich die Magnetit-Beladung der Nanokomposite sowie die Effizienz dieser Magnetit-Einkapselung berechnet werden. Konkret wurden mit dieser Methode die Nanokomposite untersucht, die unter Verwendung der Magnetit-NP der Bezugsquelle 1 hergestellt wurden. Im Hinblick auf Eisenbestimmung wurde 1 ml der jeweilig hergestellten Partikelsuspension entnommen und zentrifugiert (10.000 x g, 20 min). Das resultierende Pellet wurde anschließend in Wasser resuspendiert, gefriergetrocknet und gewogen. Für die Analyse des darin enthaltenen Eisens wurden die getrockneten Kompositpartikel zur vollständigen Zerstörung bzw. Aufschluss der Polymermatrix für 4 h mit Königswasser versetzt. Diese Aufschlusslösung wurde anschließend mit 2%iger Salzsäure verdünnt, bevor sie in die ICP-MS (Serie 7500) der Firma Agilent (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Ratingen) eingebracht und analysiert wurde. Basierend auf dem hierbei bestimmten Eisengehalt lässt sich auf den Magnetitgehalt schließen. Unter dessen Verwendung lässt sich schließlich die Beladung und Einkapselungseffizienz für Magnetit ermitteln. Die genaue Berechnung dieser Kennzahlen sowie die Umrechnung von Eisen auf Magnetit ist im Kapitel 2.3.1.6 näher beschrieben.

2.2.6 Hochauflösende Kontinuumsstrahler-Atomabsorptionsspektrometrie

Die hochauflösende Kontinuumsstrahler-Atomabsorptionsspektrometrie, engl. high-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry (HR-CS-AAS), ist eine atomspektralanalytisches Verfahren zur Elementanalyse. Das Grundprinzip der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) besteht darin, die zu analysierende, atomisiert vorliegende Probe zu bestrahlen und die Absorption dieser Strahlung messtechnisch zu erfassen. Aufgrund der elementspezifischen

Absorption kann über die Schwächung des eingestrahlt Lichtes auf die entsprechende Konzentration des Elements geschlossen werden. Demnach gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz. Durch die Nutzung unterschiedlicher Verdampfungs- und Atomarisierungstechniken existieren zahlreiche Formen der AAS. Eine ausführliche Beschreibung dieser findet sich in der entsprechenden Fachliteratur^[124, 125]. Die in dieser Arbeit genutzte Form, die hochauflösende Kontinuumsstrahler-AAS, stellt eine relativ neue Weiterentwicklung dar. Das besondere hier ist die Nutzung einer speziell entwickelten Xenon-Kurzbogenlampe als kontinuierliche Strahlungsquelle. Damit lassen sich alle Elemente und Wellenlängen abdecken, wodurch mehrere Elemente parallel analysiert werden können.^[126] Die Wahl des Atomisators ist dabei unabhängig von der Verwendung des Kontinuumsstrahlers. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Atomisierung mittels Graphitrohrofen.

Die HR-CS-AAS Messungen wurden am INM – Leibniz-Institut für Neue Materialien unter der Leitung von Frau Dr. Claudia Fink-Straube (Leiterin der Abteilung Chemische Analytik) vorgenommen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Analyse des Eisengehalts unterschiedlich hergestellter magnetischer Nanokomposite herangezogen. Genauer gesagt handelte es sich um Nanokomposite, die unter Verwendung von Magnetit-NP der Bezugsquelle 2 hergestellt wurden. Der Eisengehalt ist essentiell, um die beiden zur Beurteilung der Herstellung relevanten Kenngrößen Einkapselungseffizienz und Beladung zu berechnen. Die Proben-Vor- und Aufbereitung erfolgten analog zur Eisenbestimmung via ICP-MS (vgl. 2.2.5). Die Aufschlusslösungen der untersuchten Proben wurden, um im dynamischen Bereich der Kalibration zu bleiben, mit 2%iger HCl entsprechend verdünnt. Die Eisenbestimmung erfolgte an einem HR-CS AAS ContrAA 700 im Graphitrohrmodus der Firma Analytik Jena (Analytik Jena AG, Jena). Durch den Flüssig-Probengeber MPE 60 (Analytik Jena AG, Jena) wurde die Probe automatisiert aufgegeben. Anschließend wurde sie nach einem speziellen Temperatur/Zeit-Programm im Graphitrohrföfen atomisiert und analysiert. Die bestimmten Eisenkonzentrationen (Fe) wurden in der vorliegenden Arbeit in Magnetitkonzentrationen (Fe_3O_4) umgerechnet. Diese Umrechnung sowie die drauf basierende Bestimmung der beiden Kennzahlen Beladung und Einkapselungseffizienz ist in Kapitel 2.3.1.6 gezeigt.

2.2.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie, engl. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), ist eine flüssigchromatographische Trenn- und Analysetechnik. Das zu trennende Stoffgemisch, aufgenommen in der sogenannten mobilen Phase, wird hierbei mit hohem Druck durch eine Trennsäule, die mit der sogenannten stationären Phase dicht bepackt ist, geleitet. Der eigentliche Trennprozess resultiert aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkung der im Stoffgemisch enthaltenen Komponenten mit den beiden Phasen. Je ausgeprägter diese ist, desto länger dauert es bis die entsprechende Substanz eluiert und detektiert wird. Im Hinblick auf die stoffliche Zusammensetzung der beiden Phasen unterscheidet man verschiedene HPLC-Modi. Im Normalphasen-Modus ist die stationäre Phase polar und die mobile

Phase apolar, wohingegen im Umkehrphasen-Modus dies genau gegensätzlich ist. Für eine vertiefende Darstellung der einzelnen Modi sowie der theoretischen Grundlagen sei an dieser Stelle auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen.^[127]

In der vorliegenden Arbeit wurde die HPLC zur quantitativen Gehaltsbestimmung von Ciprofloxacin in den hergestellten Ciprofloxacin co-beladenen Nanokompositen herangezogen. Für die HPLC-Analyse wurde auf eine im Arbeitskreis für diese Substanz etablierte HPLC-Methode im Umkehrphasen-Modus zurückgegriffen. Es wurde ein Dionex UltiMate 3000 HPLC-System verwendet. Die Trennung erfolgte durch eine LiChrospher®100 RP-18 Säule (125 x 4 mm; 5µm) und einer mobilen Phase bestehend aus 25 mM Orthophosphorsäure (pH 3; adjustiert mit Triethylamin) und Acetonitril (87:13, v/v) mit einer isokratischen Flussrate von 1,5 ml/min. Die Detektion von Ciprofloxacin erfolgte bei einer Wellenlänge von 278 nm. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Messungen 50 µl.

Für die quantitative Bestimmung des in den co-beladenen Kompositpartikel verkapselten Ciprofloxacin wurden die zuvor gefriergetrockneten Partikel, zur Auflösung der Polymermatrix, in DMSO gelöst. Für die RP-HPLC-Analyse wurden hiervon 500 µl in ein HPLC-Probengefäß überführt und analysiert. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden Ciprofloxacin-Standardlösungen unterschiedlichster Konzentrationen verwendet. Anhand dieser Kalibriergerade wurde die CiprofloxacinKonzentration in den Proben bestimmt.

2.3 Experimentelle Methoden

Dieses Kapitel befasst sich mit den experimentellen Methoden und Versuchsaufbauten, die im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fanden bzw. entwickelt wurden. Zunächst wird in diesem Kontext die Herstellung der magnetischen Nanokompositpartikel, einschließlich des zugrundeliegenden Prinzips, vorgestellt. Es folgt die Darstellung der experimentellen Vorgehensweise bezugnehmend auf die induktive Erwärmbarkeit dieser Partikel. Darüber hinaus wird der experimentelle Ansatz zur Untersuchung der temperaturabhängigen Mukuspenetration dieser Partikel vorgestellt – der Kernhypothese dieser Arbeit.

2.3.1 Herstellung magnetischer Nanokomposite

2.3.1.1 Nanopräzipitation: Kurzvorstellung der Herstellungsmethode

Die Herstellung der magnetischen Nanokompositpartikel erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nach der Nanopräzipitationsmethode. Ein für Nanopartikel auf Polymerbasis als relativ einfach, kostengünstig und schonend beschriebenes Herstellungsverfahren. Darüber hinaus besitzt diese Methode neben ihrer prinzipiellen Scale-up-Fähigkeit ein hohes Automatisierungspotenzial und offeriert die Steuerbarkeit der Partikelgröße.^[128, 129] Aspekte, die einen

industriellen Einsatz dieser Methode grundsätzlich begünstigen und mitentscheidend für deren Auswahl im Rahmen dieser Arbeit waren.

Eingeführt und etabliert wurde diese Technik zur Herstellung polymerer Nanopartikel Ende der achtziger Jahre von Fessi et al.^[130]. Das der Methode zugrundeliegende Prinzip der Partikelherstellung besteht darin ein in organischem Lösemittel gelöst vorliegendes Polymer mit einem Nichtlösemittel in Kontakt zu bringen. Infolgedessen präzipitiert das Polymer in nanoskaliger partikulärer Form. Grundvoraussetzung hierfür ist die vollständige Mischbarkeit des Nichtlösemittels mit dem Polymerlösemittel.

Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Partikelbildung ist hingegen wesentlich komplexer und konnte bis dato noch nicht vollständig geklärt werden. Ein in der Literatur diskutierter und favorisierter Erklärungsansatz für die Partikelentstehung bei dieser Methode ist der sogenannte „Ouzo-Effekt“.^[129, 131] Die Namensgebung dieses Effekts rührt von der sich einstellenden milchigen Trübung durch Zugabe von Wasser zu anishaltigen Spirituosen, wie Ouzo. Der zugrunde liegende und auf die Partikelentstehung übertragbare Mechanismus dieser Trübung erklärt sich wie folgt: Das im Ouzo enthaltene, gelöst vorliegende ätherische Öl, Anethol verhält sich ähnlich zu dem im Lösemittel gelöst vorliegenden Polymer. Durch Kontakt mit dem Nichtlösemittel resultiert eine Übersättigung, wodurch die Bildung von Nukleationskeimen induziert wird. Die einsetzende Aggregation dieser Keime zu größeren Tröpfchen wirkt der Übersättigung entgegen. Ist die wässrige Phase nicht mehr mit dem Anethol übersättigt stoppt die Agglomeration. Die milchige Trübung entsteht letztlich durch die Streuung des Lichts an den resultierenden kolloidalen Teilchen. Der geschilderte Mechanismus lässt sich auf die Nanopartikelbildung bei der Nanopräzipitation übertragen. Die lokale Übersättigung des Polymers wird durch die Diffusion des Lösemittels in das Nichtlösemittel induziert. Es resultiert ein metastabiler Zustand, der wie zuvor für das Öl beschrieben, eine spontane Nukleation des Polymers bewirkt. Diese Polymerkeime aggregieren nach dem LaMer-Modell bis die kritische Keimbildungskonzentration unterschritten wird und sich die kolloidale Stabilität einstellt.^[131]

2.3.1.2 Herstellung von Magnetit-PLGA-Nanopartikeln

Für die Verkapselung der Magnetit-NP in die aus PLGA bestehende Polymermatrix wurde sich auf die Nanopräzipitationsmethode festgelegt. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Vorgehensweise ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt. In einem ersten Schritt (1) wird das Polymer PLGA in einem Lösemittel (LM), hier Aceton, gelöst. Der Polymerlösung werden anschließend die in Chloroform vorliegenden, zu inkorporierenden, Magnetit-NP (20 mg/ml; 10 nm) zugegeben. Zum Lösen des Polymers, bzw. Homogenisieren der in der Lösung dispergiert vorliegenden Magnetit-NP, wird die Polymerlösung für 4 min mit Ultraschall beschallt. Anschließend folgt die eigentliche Nanopräzipitation (2). Hierzu wird die Magnetit-NP enthaltende Polymerlösung (A) in eine Spritze aufgezogen und langsam, unter Rühren in das Nichtlösemittel (B) präzipitiert. Das Nichtlösemittel stellt eine wässrige

Polyvinylalkohol-(PVA)-Lösung (2%) dar. Der Kontakt mit dem Nichtlösemittel induziert, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, die Fällung des Polymers in nanopartikulärer Form. Die resultierenden Magnetit-PLGA-NP liegen letztlich suspendiert vor.

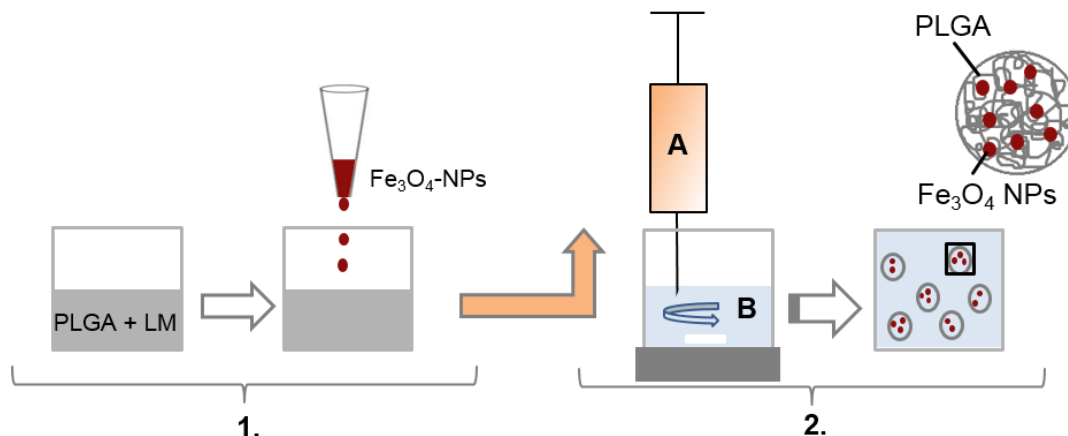


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Herstellung von Magnetit-PLGA-NP nach der Nanopräzipitationsmethode. Hierbei wird zunächst das Polymer im Lösemittel gelöst, bevor die zu inkorporierenden Magnetit-NP zugegeben und darin homogenisiert werden (I). Daran schließt sich die eigentliche Partikelherstellung an, bei der die Polymerlösung mit den darin enthaltenen Magnetit-NP (A), mittels Spritze in ein Nichtlösemittel (B) präzipitiert werden. Das Nichtlösemittel wird während des Injizierens der Polymerlösung gerührt.

Im Zuge einer anfänglichen Methodenentwicklung erfolgte die Einflussuntersuchung unterschiedlicher Mengen an Magnetit-NP auf deren Verkapselung und Einbettung in die Polymermatrix. Hierzu wurden 35 µl, 50 µl und 85 µl der in CHCl₃ dispergierten Magnetit-NP (d. h. 0,7 mg, 1,0 mg und 1,7 mg) der Polymerlösung zugegeben. Die Methodenentwicklung erfolgte unter Verwendung der von Bezugsquelle 1 erhaltenen Magnetit-NP. Für die Partikelherstellung wurde in der vorliegenden Arbeit die Magnetit-NP enthaltende Polymerlösung unter Rühren (1000 rpm) in 10 ml PVA-Lösung injiziert. Die Konzentration der Polymerlösung wurde auf 16,67 mg/ml festgelegt. Hierzu wurden 25 mg PLGA (Resomer RG 503H, 50:50) in 1,5 ml Aceton gelöst. Im Rahmen der Arbeit wurden die Herstellungsparameter nach der anfänglichen Methodenentwicklung nicht weiter variiert. Sofern es nicht ausdrücklich anders angegeben ist, erfolgte die Herstellung von Magnetit-beladenen PLGA-NP unter Verwendung von 50 µl, d. h. 1 mg Magnetit-NP. Das entspricht der mittleren, der hier evaluierten Magnetit-Menge. Darüber hinaus wurden die Kompositpartikel im späteren Verlauf der Arbeit, nach einer entsprechenden Evaluierung (Übertragbarkeit auf die Partikel aus Bezugsquelle 2 war gegeben) ausschließlich mit Magnetit-NP von Bezugsquelle 2 hergestellt.

2.3.1.3 Herstellung von fluoreszierenden Magnetit-PLGA-Nanopartikeln

Die Herstellung fluoreszenzmarkierter Magnetit-PLGA-NP erfolgte analog zu der im vorherigen Kapitel beschriebenen Herstellung von Magnetit-beladenen PLGA-NP. Der einzige Unterschied besteht in der Verwendung von Rhodamin B markiertem PLGA (RhoBPLGA). Die Fluoreszenzmarkierung des Polymers erfolgte in Anlehnung an das von Horisawa et al. etablierte Protokoll ^[132, 133]. Durch Verwendung dieses PLGA-Typs sind die resultierenden Nanopartikel unter Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge detektierbar. Die Menge an Polymer, Magnetit-NP, Lösemittel und Nichtlösemittel sowie alle andere Prozessparameter wurden gleich gehalten. Die Magnetit-RhoBPLGA-NP wurden demnach unter Verwendung von 25 mg RhoBPLGA, 1,5 ml Aceton, 50 µl Magnetit-NP (20 mg/ml in CHCl_3) sowie 10 ml PVA-Lösung (2%) hergestellt.

2.3.1.4 Herstellung von Cipro co-beladenen Magnetit-PLGA-Nanopartikeln

Die Herstellung magnetischer Nanokompositpartikel, in denen zusätzlich der Wirkstoff Ciprofloxacin (Cipro) inkorporiert vorliegt, erfolgte in Anlehnung an die zuvor in Kapitel 2.3.1.2 beschriebene Methode zur Herstellung von Magnetit-PLGA-NP. Die zusätzliche Einbettung von Cipro erforderte entsprechende Modifikationen in der Vorgehensweise, die in Abbildung 17 indiziert sind. Um den Wirkstoff zusammen mit den Magnetit-NP in der Polymermatrix einzubetten, wird dieser in dem ersten Schritt mit dem Polymer in Lösung gebracht. Dieser Wirkstoff-Polymerlösung werden anschließend die Magnetit-NP zugesetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zur Herstellung der Magnetit-PLGA-NP.

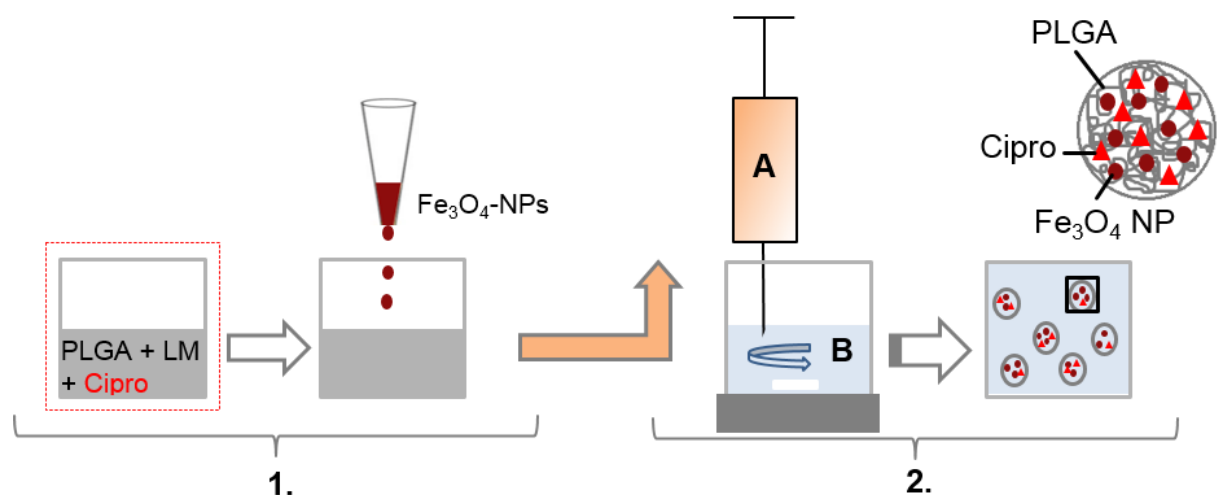


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Herstellung von Cipro co-beladenen Magnetit-PLGA-NP nach der Nanopräzipitationsmethode. Hierbei werden zunächst das Polymer und der Wirkstoff Ciprofloxacin im Lösemittel gelöst. Danach werden die zu inkorporierenden Magnetit-NP zugegeben und darin homogenisiert (I). Daran schließt sich die eigentliche Präzipitation an (2). Hierbei wird die Polymer-Wirkstoff-Lösung, samt darin dispergiert vorliegender Magnetit-NP (A), in ein Nichtlösemittel (B) injiziert.

Die bedeutendste Abweichung im Herstellungsprozess gegenüber der Herstellung der Magnetit-PLGA-NP betrifft das Lösemittel. Die angestrebte Co-Verkapselung von Ciprofloxacin erforderte einen Wechsel des Lösemittels von Aceton auf DMSO. Dies liegt im Wesentlichen in der deutlich besseren Löslichkeit des Wirkstoffkomplexes in DMSO gegenüber Aceton begründet ($24,8 \text{ mg/ml} \triangleq \text{Löslichkeit in DMSO}$; $289,6 \text{ µg/ml} \triangleq \text{Löslichkeit in Aceton}$).^[116] Zur Herstellung der Partikel wurde der Ciprofloxacin-SDS Komplex gemeinsam mit dem PLGA (Resomer RG 503H, 50:50) in DMSO gelöst. Die Konzentration des Wirkstoffs betrug hierbei $3,3 \text{ mg/ml}$, die Polymerkonzentration $16,67 \text{ mg/ml}$. Um den Einfluss unterschiedlicher Mengen an Magnetit-NP auf die Co-Verkapselung zu untersuchen wurden 35 µl , 50 µl und 85 µl der in CHCl_3 dispergierten Magnetit-NP (d. h. $0,7 \text{ mg}$, $1,0 \text{ mg}$ und $1,7 \text{ mg}$) der Polymerlösung zugegeben. Die Polymer- und Wirkstoffmenge wurde hingegen konstant gehalten. Das Lösen des Wirkstoffs und Polymers erfolgte ebenso wie das Homogenisieren der in der Wirkstoff-Polymer-Lösung vorliegenden Magnetit-NP unter Einwirkung von Ultraschall. Die vorbereitete, die Magnetit-NP enthaltende Wirkstoff-Polymerlösung wurde anschließend zur Partikelbildung in die PVA-Lösung (2%) injiziert. Das Nichtlösemittel ist, wie bei der Herstellung der Magnetit-PLGA-NP, vollständig mit dem LM, hier DMSO, mischbar.

2.3.1.5 Aufreinigung, Trocknung und Aufkonzentrierung der Partikel

Aufreinigung

Die Aufreinigung der nach Herstellung in suspendierter Form vorliegenden Nanokompositpartikel erfolgte in der vorliegenden Arbeit primär durch Zentrifugation. Eine derartige Aufreinigung wurde zur Bestimmung der Beladungs- und Einkapselungseffizienz, entweder bezogen auf die Magnetit-NP oder im Falle der co-beladenen Partikel des Ciprofloxacins vorgenommen. Die Zentrifugation sollte, sofern vorhanden, nicht verkapselte Substanzen entfernen, um sie als Störfaktor in der nachfolgenden Quantifizierung auszuschließen. Zudem wurde darüber der Stabilisator PVA, der in der finalen Partikelsuspension vorliegt und unabgetrennt die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Partikel stört, entfernt. Wenn nicht anders angegeben wurden die Partikel bei $10.000 \times g$ für 20 min zentrifugiert. Die sich anschließende Resuspendierung der Partikel erfolgte mit Wasser.

Eine spezielle Form der Aufreinigung wurde für die TEM-Bild basierte Untersuchung hinsichtlich des Einflusses der eingesetzten Magnetit-NP auf die resultierende Verkapselung dieser NPs in die PLGA-Matrix vorgenommen. In einem dieser Untersuchungen vorgeschalteten Arbeitsschritt wurden 500 µl der jeweiligen Partikelsuspension auf eine Midi MACS Säule (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach) gegeben. Hierbei handelt es sich um eine mit Eisenkugeln gepackte Säule, die in ein Magnetfeld eingebracht, Probenkomponenten aufgrund von magnetischen Anziehungskräften zurückhalten kann. Hierdurch sollten unbeladene PLGA-NP von Magnetit-NP beladenen PLGA-NP abgetrennt werden, um den einflussnehmenden Effekt der Magnetit-NP Konzentration auf die Beladung besser untersuchen zu können.

Trocknung

Die Trocknung der Nanokomposite erfolgte im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung der Gefriertrocknung. Hierfür wurden die aufgereinigten, in suspendierter Form vorliegenden, Partikel zunächst bei -80 °C vorgefroren. Zur Entfernung des enthaltenen Wassers wurden die tiefgefrorenen Proben anschließend in die Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Der Trocknungsvorgang belief sich, abhängig vom Probenvolumen, auf 24 - 72 h. Nach erfolgter Gefriertrocknung wurde das Lyophilisat gewogen. Eine derartige Trocknung war zur Bestimmung der Beladungs- und Einkapselungseffizienz sowie zur magnetischen Charakterisierung der Kompositpartikel mittels der VSM vorzunehmen.

Aufkonzentrierung

Die Aufkonzentrierung der hergestellten Nanokompositen erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch Zentrifugation und anschließender Resuspendierung in einem entsprechenden kleineren Volumen. Erforderlich war diese Aufkonzentrierung bei der induktiven Erwärmung der magnetischen Kompositpartikel. Zur induktiven Partikelerwärmung wurden zwei Formulierungsansätze gereinigt und mittels Zentrifugation auf 0,5 ml eingeeengt (10.000 x g, 30 min). Eine derartige Aufkonzentrierung war notwendig, um eine Erwärmung, beziehungsweise deren messtechnische Erfassung, realisieren zu können.

2.3.1.6 Berechnung der Kennzahlen, Beladung und Einkapselungseffizienz

Ciprofloxacin

Die Beladung und Einkapselungseffizienz von Ciprofloxacin wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Beladung (\%)} = \frac{\text{Masse Cipro in Partikel}}{\text{Masse Partikel}} \times 100$$

$$\text{EE(\%)} = \frac{\text{Masse Cipro}_{\text{Partikel}} / \text{Masse Partikel}}{\text{Masse Cipro}_{\text{eingesetzt}} / \text{Trägermaterial}_{\text{eingesetzt}}} \times 100$$

Die Masse an Cipro in den Partikeln bezieht sich hierbei auf die in den gefriergetrockneten Partikeln unter Verwendung der HPLC analysierte Menge. Durch das Volumen, das zur Auflösung der gefriergetrockneten Partikel verwendet wurde, lässt sich von der Cipro-Konzentration auf die in den Partikeln verkapselte Cipro-Menge rückschließen.

Magnetit

Die Bestimmung der Beladung und Einkapselungseffizienz von Magnetit erfolgte nach den beiden nachstehenden Formeln:

$$\text{Beladung (\%)} = \frac{\text{Masse Magnetit in Partikel}}{\text{Masse Partikel}} \times 100$$

$$\text{EE(\%)} = \frac{\text{Masse Magnetit verkapselt}}{\text{Masse Magnetit eingesetzt}} \times 100$$

Die Masse an Magnetit in den Partikeln bezieht sich hierbei auf die in den gefriergetrockneten Partikeln unter Verwendung der ICP-MS bzw. HR-CS-AAS analysierte Menge an Eisen. Nach Auflösung der Polymermatrix lässt sich über den ermittelten Eisengehalt auf den Magnetitgehalt schließen. Unter Berücksichtigung der chemischen Formel von Magnetit, d. h. Fe_3O_4 , lässt sich die Konzentration des Sauerstoffs unter Verwendung der molaren Masse von Sauerstoff ($M_{\text{O}} = 16 \text{ g/mol}$) und Eisen ($M_{\text{Fe}} = 55,85 \text{ g/mol}$) folgendermaßen herleiten:

$$c_{\text{O}} = 4/3 \cdot c_{\text{Fe}} (M_{\text{O}}/M_{\text{Fe}})$$

Die Massenkonzentration von Magnetit (Fe_3O_4) entspricht demnach:

$$c_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = c_{\text{Fe}} + c_{\text{O}}$$

Eine derartige Umrechnung in Magnetit wurde für sämtliche, in dieser Arbeit bestimmten, Eisenkonzentrationen vorgenommen.

2.3.2 Induktives Heizen magnetischer Nanokomposite

2.3.2.1 Etablierung eines Setups zum induktiven Heizen

Für die angedachte Applikation des hier entwickelten Wirkstoffträgersystems ist die Eigenschaft sich in einem Magnetwechselfeld induktiv zu erwärmen essentiell. Inwieweit die hergestellten magnetischen Kompositpartikel dieses Kernkriterium erfüllen, stellte einen wichtigen Untersuchungsaspekt dieser Arbeit dar. Dafür galt es ein entsprechendes Set-up zu entwickeln, welches neben dem induktiven Heizen der Partikel eine präzise Messung der generierten Wärme ermöglicht.

Set-up zur Induktionserwärmung und Temperaturmessung

Das in dieser Arbeit verwendete Set-up für die Induktionserwärmung und Temperaturmessung ist modular aufgebaut. In Abbildung 18 sind die einzelnen Komponenten dieses Setups schematisch dargestellt.

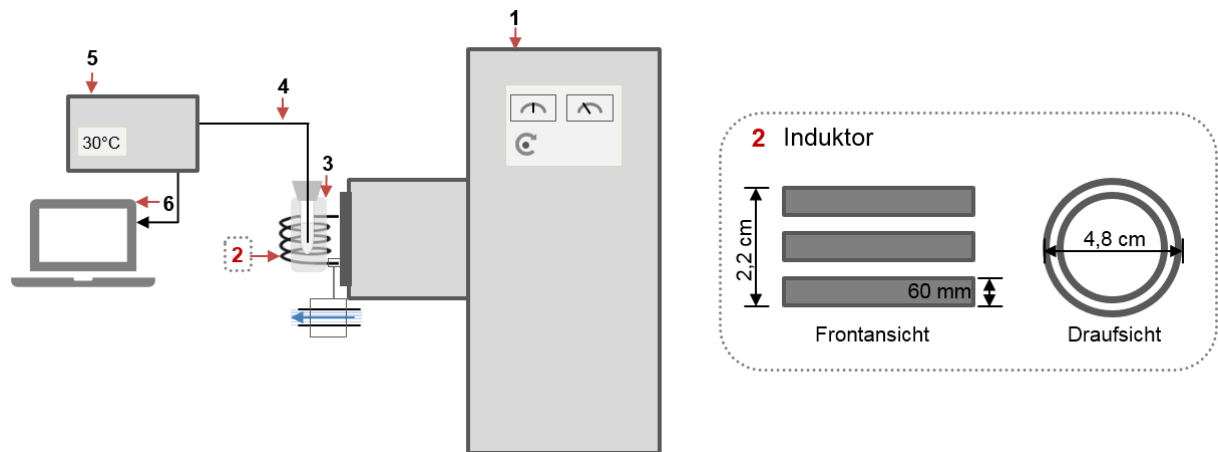


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Setups zur Induktionserwärmung und Temperaturmessung. Dieses Setup umfasst den Hochfrequenzgenerator IG 5/30000 (1), die drei windige, wassergekühlte Kupferspule, den sogenannten Induktor (2), die Probenkammer mit der induktiv zu erwärmenden Probe (3), den faseroptischen Temperatursensor (4), das Temperaturmessgerät (5), sowie einen daran angeschlossenen PC zur Darstellung und Weiterverarbeitung des Temperaturverlaufs (6).

Für die Induktionserwärmung der Partikel wurde auf den Hochfrequenzgenerator IG 5/30000 (1) der Firma Trumpf Hüttinger (Hüttinger Elektronik GmbH + Co. KG, Freiburg im Breisgau) und einer daran gekoppelten dreiwindigen zylindrischen Kupferspule (2) zurückgegriffen. Die Spule, als Induktor bezeichnet, hatte in der vorliegenden Arbeit einen Durchmesser von 4,8 cm und eine Länge von 2,2 cm. Sowohl die Spule, als auch der Generator sind aufgrund der hohen Ströme und der dadurch resultierenden Überhitzungsgefahr an eine Wasserkühlung angeschlossen. Der verwendete Generator hat eine maximale Frequenz von 2000 kHz. Bei der hier verwendeten Spulengeometrie wurde eine Magnetfeldstärke von näherungsweise 62 kA/m berechnet (Mohring, J., Persönliche Mitteilung, Trumpf Hüttinger GmbH & Co KG, Freiburg, 2015). Der Generator dient als Energiequelle des Erwärmungsprozesses, wobei sich die gewünschte Hochfrequenz (HF)-Ausgangsleistung über ein Potentiometer variieren bzw. einstellen lässt. Der generierte Wechselstrom wird vom Generator an die daran gekoppelte Spule übertragen. Infolgedessen wird durch die wechselstromdurchflossene Spule ein Magnetwechselfeld erzeugt. Dieses induziert letztlich die induktive Erwärmung der sich in der Spule befindlichen magnetithaltigen Proben. Um diese Erwärmung unter kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen zu ermöglichen, befindet sich die zu erwärmende Probe in einer speziell dafür entwickelten Probenkammer (3). Das Design und die Entwicklung dieser Probenkammer sind im nächsten Abschnitt ausführlich beschrieben.

Zur Temperaturmessung wurde in der vorliegenden Arbeit das faseroptische Temperaturmessgerät Fototemp 1-4 (5) mit einem daran gekoppelten faseroptischen Temperatursensor (4) (Sensortyp TS4; Messgenauigkeit: $\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$; Optocon AG, Dresden) verwendet. Die faseroptische Temperaturmessung ermöglicht eine äußerst präzise Messung der Temperatur ohne dabei von magnetischen Feldern beeinflusst zu werden – beides Kriterien für die Wahl dieser Art von Temperaturmessung im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Die darüber gemessene Temperatur wurde während des kompletten Erwärmungsprozesses unter Verwendung

der Software "FOTEMP Assistent" (Optocon AG, Dresden) an einem PC (6) aufgezeichnet und anschließend weiterverarbeitet.

Probenkammer – Evaluierung, Entwicklung und Design

Im Hinblick auf eine reproduzierbare Wärmeerzeugung sowie deren störungsfreie Detektion wurde im Rahmen der Arbeit die Entwicklung einer entsprechenden Probenhalterung angestrebt. Das Design dieser Halterung erfolgte unter Berücksichtigung der folgenden drei Kernaspekte:

- mittige Position der Probe innerhalb der Spule
- mittige Position des faseroptischen Sensors innerhalb der Probe
- Isolierung der Probe

Von physikalischen Gesichtspunkten betrachtet ist das Magnetfeld in der Mitte einer zylindrischen Spule am stärksten. Ziel war es daher, die Probe während der induktiven Erwärmung mittig in der Spule zu positionieren. Dadurch sollte eine maximale Wärmegenerierung ermöglicht werden. Für den Temperatursensor wurde ebenfalls eine mittige Position in der Probe angestrebt. Zudem sollte die Möglichkeit bestehen diese Sensorposition probeübergreifend konstant zu halten. Eine besonders große Bedeutung wurde der Probenisolierung beigemessen. Durch eine effiziente Isolierung sollte dem Wärmeaustausch mit der Umgebung und somit einem Energieeintrag respektive einem Energieverlust entgegengewirkt werden. Die nicht kontrollierbare Raum- und Spulentemperatur wurden in diesem Kontext, als potentielle Einflussfaktoren gewertet. Um die induktive Erwärmung sowie die Messung der Wärmegenerierung unter quasi adiabatischen Bedingungen durchführen zu können, wurden mehrere Materialien zu Isolationszwecken getestet. Die Auswahl der Testmaterialien erfolgte unter den Gesichtspunkten: Geringe Wärmeleitfähigkeit und gute Verform- und Bearbeitbarkeit. Die getesteten Materialien umfassen den Polyethylenschaum Tubolit® ($\lambda_{40\text{ °C}} = 0,040\text{ W/mK}$; Armacell GmbH, Münster), den synthetische Kautschukschaum Armaflex ($\lambda_{40\text{ °C}} \leq 0,037\text{ W/mK}$; Armacell GmbH, Münster) sowie Neopor®, einen Schaumstoff auf Polystyrolbasis ($\lambda_{10\text{ °C}} = 0,032\text{ W/mK}$; BASF SE, Ludwigshafen). Die angegebenen Wärmeleitfähigkeiten (λ) wurden dem vom Hersteller und Vertreiber herausgegeben Technischen Datenblatt entnommen. Darüber hinaus wurde ein doppelwandiges Vakuum-Glasgefäß designt und in der universitätseigenen Glasbläserei angefertigt (Günther Berlin, Servicestelle Glasbläserwerkstatt, Universität des Saarlandes).

Für die Evaluierung der Materialien hinsichtlich ihrer Eignung als thermischer Isolator wurde jeweils ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 1 ml 50 °C-temperiertem Wasser in die Isolierung eingebracht. Nachfolgend wurde der Temperaturabfall über die Zeit gemessen. In einem zweiten Versuchsaufbau wurde das, im Isolator befindliche, raumtemperierte Wasser einem 50 °C bzw. 30 °C warmen Wasserbad ausgesetzt und der Temperaturverlauf gemessen. Für die

Temperaturmessungen wurden das faseroptische Temperaturmessgerät und der entsprechende Sensor verwendet (Sensortyp TS4; Messgenauigkeit: $\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$; Optocon AG, Dresden).

In diesen Evaluierungsexperimenten, soviel sei an dieser Stelle den Ergebnissen in 3.2.1 vorweggegriffen, zeigte sich die eigens konstruierte Vakuum-Probenkammer als die geeignetste Variante. Basierend darauf wurden sämtliche Heizexperimente der vorgelegten Arbeit unter Verwendung dieser Probenkammer vorgenommen. In der Abbildung 19 ist der Aufbau der hier entwickelten Probenhalterung sowie deren Positionierung in der Spule gezeigt. Die induktiv zu erwärmende Probe wird in einem Eppendorf Reaktionsgefäß in die doppelwandige Vakuumkammer eingebracht. Zur Bestimmung der Temperatur wird ein faseroptischer Sensor mit Hilfe einer entsprechenden Befestigungsvorrichtung mittig in der Probe positioniert. Der Proberaum ist nach oben hin durch eine spezielle Korkabdichtung isoliert.

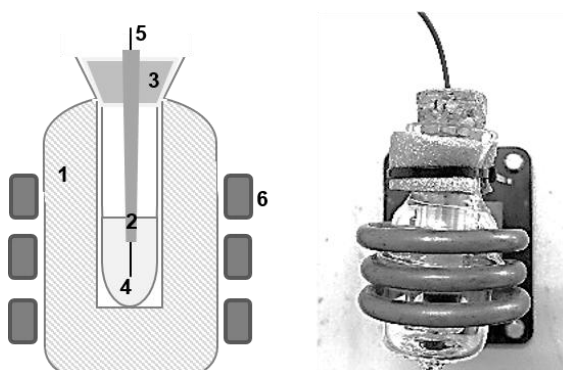


Abbildung 19: Entwickelte Probenhalterung zur induktiven Erwärmung der Partikel. Die Probenkammer besteht aus einem doppelwandigen evakuierten Glasgefäß (1), in das die induktiv zu erwärmende Probe in einem Eppendorf Reaktionsgefäß eingebracht wird (4). Der optische Temperatursensor (5) wird unter Verwendung einer Befestigungsvorrichtung (2) mittig in der Probe fixiert. Eine Korkabdichtung (3) schließt den Proberaum nach oben hin ab. Die Vakuum-Kammer ist so konstruiert, dass die Probe mittig in der Spule (6) positioniert ist.

2.3.2.2 Identifikation von Einfluss- und geeigneten Heizparametern

Die induktive Erwärmung der hergestellten magnetischen Kompositpartikel ist einer der Kernaspekte in dieser Arbeit. Für die angestrebte Applikation des hier entwickelten nanopartikulären Kompositsystems ist diese Art der Erwärmbareit von essentieller Bedeutung. Im Hinblick darauf wurden potentielle Einflussfaktoren auf den induktiven Erwärmungsprozess untersucht. Ziel dieser Einflussuntersuchung war die Findung optimaler Parameter für eine effiziente Wärmeentwicklung. Vor dem Hintergrund, dass die magnetisch induzierte Wärmegenerierung von den in der Polymermatrix inkorporierten Magnetit-NP ausgeht, erfolgte diese Evaluierung unter Verwendung von unverkapselten Magnetit-NP. Im Rahmen der Prozess-evaluierung wurden die folgenden Parameter in Hinsicht auf eine effiziente Magnetit-NP Wärmeentwicklung untersucht:

- Konzentration der Magnetit-NP
- HF-Ausgangsleistung

Im Rahmen dieser Evaluierung wurden drei unterschiedliche Heizleistungen sowie drei verschiedene Partikelkonzentrationen getestet. Die Heizleistung bzw. die Hochfrequenzabgabe des Generators wurde, über ein Potentiometer, unter Berücksichtigung der im Anzeigeinstrument angezeigten Anodenspannung und des damit korrelierenden Anodenstroms (in % des Maximalwertes), eingestellt. Der darüber eingestellte Sollwert entsprach für die drei vorgenommenen Einstellungen (20V20A, 40V34A, 60V52A) 4%, 13,6% und 31,2% des vom Hersteller angegebenen Maximalwerts von 7,2 kW. Damit wurden der Einfluss auf die Partikelerwärmung unter den Ausgangsleistungen von 0,23 kW, 1,01 kW sowie 2,3 kW getestet. Bezüglich der Partikelkonzentration wurde neben der Ausgangskonzentration von 20 mg/ml auch 2 mg/ml und 0,2 mg/ml getestet. Hierzu wurden die in Chloroform vorliegenden Magnetit-NP, ausgehend von ihrer Anfangskonzentration von 20 mg/ml entsprechend verdünnt. Für die Heizexperimente wurden 0,5 ml der entsprechenden Partikeldispersion in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in die Probenkammer eingebracht. Der faseroptische Sensor wurde mittig in der Probe positioniert. Vor Beginn der induktiven Erwärmung wurde gewartet bis sich in der Probe eine konstante Temperatur eingestellt hatte. Der Erwärmungsprozess belief sich in allen Experimenten auf eine Zeitspanne von 20 min. Jedes einzelne Experiment wurde zudem als Kontrollexperiment unter Verwendung von reinem Chloroform durchgeführt. Das Kontrollexperiment fand immer am gleichen Tag vor dem eigentlichen Heizexperiment statt, um Einflussfaktoren wie die Raumtemperatur oder die Temperatur des Kühlwassers in der Spule gleich zu halten. Die anschließende Normierung ermöglicht einen experimentübergreifenden Vergleich der Messdaten.

2.3.2.3 Induktionserwärmung magnetischer Nanokomposite

Die induktive Erwärmung der Magnetit-PLGA-NP erfolgte unter der zuvor evaluierten niedrigsten und höchsten Heizleistung, d. h. 0,23 kW (20V20A) respektive 2,3 kW (60V52A). Unter Berücksichtigung des aus der Evaluierung hervorgehenden Zusammenhangs zwischen Konzentration an Magnetit-NP und Wärmegenerierung wurde eine Aufkonzentrierung der Magnetit-PLGA-NP vorgenommen (siehe Kapitel 2.3.1.5). Anschließend wurden 0,5 ml der in Wasser dispergiert vorliegenden magnetischen Nanokomposite in die Probenhalterung eingebracht und induktiv erwärmt. Der Temperaturverlauf des zwanzigminütigen Erwärmungsprozesses wurde, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, unter Verwendung eines faseroptischen Messgerätes gemessen und aufgezeichnet. Bereinigt wurden die Messdaten durch ein Kontrollexperiment mit 0,5 ml reinem Wasser. Dadurch sollte ausschließlich die Wärmegenerierung der Partikel erhalten werden. Das Kontrollexperiment fand unter den gleichen Heizbedingungen statt.

Die induktive Erwärmung der aus Rhodamin B markiertem PLGA hergestellten Magnetit-PLGA-NP erfolgte analog zu der Erwärmung der Magnetit-PLGA-NP. Für die Induktionserwärmung der fluoreszierenden Nanokomposite wurde sich auf die Verwendung der höchsten Heizleistung von 2,3 kW (60V52A) beschränkt. Im Rahmen dieses Heizexperimentes sollte

lediglich die prinzipielle Machbarkeit der Induktionserwärmung dieser Partikel gezeigt werden.

2.3.3 Induktionserwärmung und Partikelmigrationsverhalten in Mukus

2.3.3.1 Etablierung eines Setups zur Untersuchung der Partikelmigration

Die Etablierung eines experimentellen Setups, mit dem sich der Einfluss induktiv generierter Wärme auf die Partikelmigration in Mukus untersuchen lässt, stellte eine Grundvoraussetzung für die weitere Vorgehensweise dar. Hinsichtlich der genannten Zielkonzeption wurden für die Entwicklung dieses Setups verschiedene Anforderungen definiert. Diese umfassen:

- Kompatibilität mit der Spulendimension und Probenkammer
- Möglichkeit einer reproduzierbaren, einfachen und schnellen Versuchsdurchführung
- relativ einfache Detektierbarkeit der Partikelmigration
- Adaptierbarkeit z. B. hinsichtlich Spulendimension oder Probenvolumina

Der nach diesen Anforderungskriterien entwickelte experimentelle Versuchsaufbau soll im Folgenden beschrieben werden. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an natürlichem Mukus erfolgte die Etablierung des nachfolgend vorgestellten Setups anhand eines Modellgels. Hierbei handelt es sich um 1%iges Hydroxyethylcellulose-Gel, nachstehend als HEC-Gel bezeichnet. Die Verwendung von HEC stützt sich auf dessen chemische Ähnlichkeit zu den, als Hauptkomponente von Mukus bekannten, Muzinen. Darüber hinaus zeigt dieses Gel ein zu Mukus ähnliches mikrorheologisches Verhalten.^[41, 42] Basierend darauf hat sich HEC als ein gängiges Modellgel für Mukus etabliert. Die Nutzung von HEC ist in diesem Zusammenhang für mehrere Forschungsansätze beschrieben.^[42, 134]

Der hier etablierte Versuchsaufbau umfasst mehrere Teilaspekte und wird in den beiden nachstehenden Abschnitten detailliert beschrieben. Der Fragestellung nachgehend, inwieweit sich das Partikelmigrationsmuster durch induktiv generierte Wärme beeinflussen lässt, galt es zunächst eine Möglichkeit zu finden diese Migration nachzuweisen. Vor diesem Hintergrund wurde sich entschieden, die magnetischen Nanokompositpartikel durch Fluoreszenzmarkierung detektierbar zu machen. Dazu wurden die Kompositpartikel nach dem etablierten Herstellungsprotokoll hergestellt, jedoch unter Verwendung von Rhodamin B markiertem PLGA. Der an das Polymer gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht unter Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge die Partikel nachzuweisen (vgl. Kapitel 2.3.1.3; Herstellung von fluoreszierenden Magnetit-PLGA-Nanopartikel).

Experimentelles Vorgehen – Partikelmigration unter Wärmeeinfluss

Die in dieser Arbeit etablierte experimentelle Vorgehensweise zur Untersuchung des Einflusses von Wärme auf die Penetration von Magnetit-beladenen PLGA-NP in Mukus ist in Abbildung 20 schematisch gezeigt. Der experimentelle Versuchsaufbau umfasst, wie in der schematischen Darstellung indiziert, mehrere Schritte, die im Folgenden vorgestellt werden.

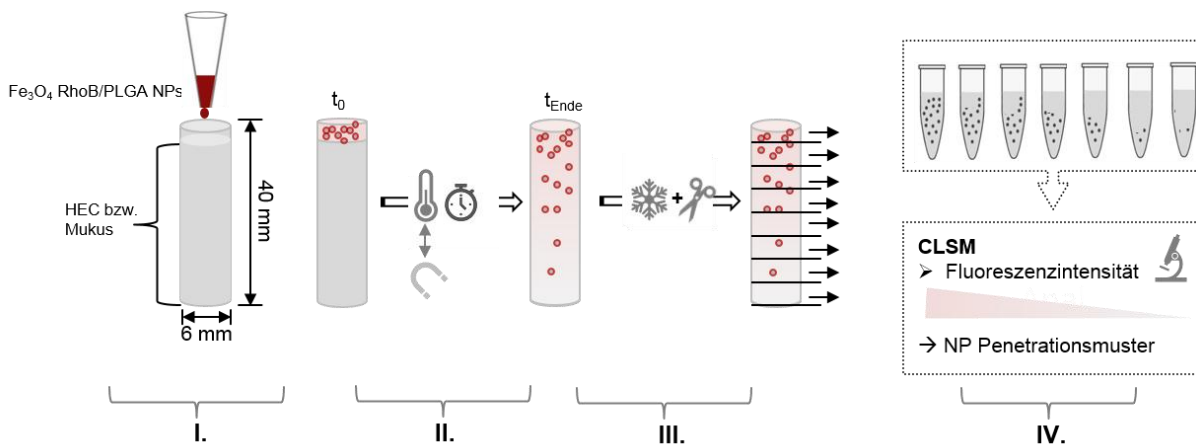


Abbildung 20: Experimentelles Setup zur Untersuchung des Einflusses von Wärme auf das Penetrationsverhalten von Magnetit-PLGA-NP. Der Versuchsaufbau gliedert sich in vier Einzelschritte. Zunächst wird ein Schlauchstück mit Mukus bzw. HEC Gel befüllt, bevor die Nanopartikelsuspension oben aufgegeben wird. Der zweite Schritt entspricht dem eigentlichen Partikelpenetrationsexperiment. Hierbei wird das Schlauchstück für eine bestimmte Zeit erwärmt, bevor es im nächsten Schritt zur Fixierung des Penetrationsmusters bei -80°C eingefroren und anschließend in 0,5 cm große Stücke geschnitten wird. Im letzten Schritt wird das Penetrationsmuster über die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Schnitte am CLSM aufgeklärt.

Das eigentliche Partikelmigrationsexperiment erfolgt nach dem hier entwickelten Set-up in einem mit Mukus bzw. Modellgel gefüllten Schlauchstück. Die Nutzung solcher Schlauchstücke erfolgte in Anlehnung an bereits publizierte Arbeiten, in denen die prinzipielle Eignung von Schläuchen oder Kapillaren für derartige Penetrationsstudien demonstriert wurde.^[42, 135] Die fluoreszierenden Partikel werden auf die Mukus- bzw. Gelschicht aufgegeben und können anschließend, so die Idee, zur Beeinflussung des Penetrationsverhaltens induktiv erwärmt werden. Die Verwendung von Schlauchstücken, die kommerziell in unterschiedlichen Dimensionen erhältlich sind, gibt dem Set-up eine gewisse Anpassungsfähigkeit. Die Einwegschauchstücke hatten im Hinblick auf die Kompatibilität zu der hier verwendeten Induktionsspule eine Länge von 4 cm und ein Durchmesser von 0,6 cm. Nach Ablauf der Erwärmungszeit sieht der etablierte Versuchsaufbau zur Beendigung der Partikelpenetration sowie der Beibehaltung des resultierenden Penetrationsmusters das Einfrieren des Schlauchstücks bei -80°C vor. Zur Beurteilung der jeweiligen Penetrationsstrecke wird anschließend das Schlauchstück in 0,5 cm breite Schnitte zerlegt. Das Schneiden mit einer scharfen Klinge erfolgt auf gefrorenem Untergrund von den Schlauchenden ausgehend. Dadurch wird verhindert, dass das gefrorene Schlauchstück während des Schneidprozesses auftaut und sich somit

das Penetrationsmuster möglicherweise nachträglich ändert. Die einzelnen Schlauchschnitte werden anschließend hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität unter Zuhilfenahme der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie, engl. confocal laser scanning microscopy (CLSM), untersucht. Diese Intensität ist proportional zur Konzentration angeregter Moleküle. Da das angeregte Fluoreszenzmolekül Bestandteil der Nanokomposite ist, lassen sich diese in den Schlauchabschnitten detektieren.

Experimentelles Vorgehen - Detektion des Partikelmigrationsmusters

Das resultierende Partikelpenetrationsmuster nach erfolgter Erwärmung wird in dem hier etablierten Set-up über die Fluoreszenzintensität der einzelnen Schnitte untersucht. Für diese Untersuchung wurde ein CLSM der Firma Carl Zeiss genutzt (LSM 710; Carl Zeiss AG, Oberkochen). Als Objektiv wurde sich auf das Wasserimmersionsobjektiv Korr M27 mit der numerischen Apertur 1,1 festgelegt. Die experimentelle Vorgehensweise und Probenpräparation ist in Abbildung 21 illustriert. In einem ersten Schritt werden 50 µl des jeweilig aufgetauten Inhalts eines Schlauchschnittes unter Verwendung einer Direktverdränger-Pipette in einen 15-Kammer-Probenhalter (15 µ-Slide Angiogene, ibidi GmbH, Martinsried) überführt. Dieser Probenhalter-Typ wurde gewählt, um einer Verdunstung des Wassers aus dem geringen Probenvolumens entgegen zu wirken. Zudem ermöglicht er, als Ausgangspunkt für die mikroskopischen Aufnahmen, ein Scharfstellen des Probenhalterbodens. Ausgehend vom Boden des Probenhalters werden an verschiedenen Positionen jeweils drei optische Schnitte in einem Abstand von 200 µm senkrecht zur Probennormalen (z-Achse) aufgenommen (z-Stack = 200 µm). Die Anregung der Rhodamin B markierten Nanokomposite erfolgte mit einer Wellenlänge von 561 nm. Die entsprechende Emission wurde bei 620 nm detektiert. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde die Empfindlichkeit des Detektors anhand einer Kontrolle ohne Partikel eingestellt, d. h. mittels reinem HEC bzw. Mukus. Die, das CLSM normalerweise charakterisierende Detektionslochblende wurde vollständig geöffnet, um maximale Intensitäten zu erhalten. Die Detektorempfindlichkeit wurde anhand der Kontrolle so eingestellt, dass gerade keine Fluoreszenz mehr detektierbar ist. Die Intensitätswerte der auf diese Weise generierten nicht-konfokalen Bilder können anschließend unter Verwendung eines speziellen Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramms ausgelesen werden (Open-Source Software ImageJ bzw. Fiji). Durch die Intensitätsmessungen der verschiedenen Schlauchstücksschnitte sollte letztlich die Penetrationsstrecke der magnetischen Nanokomposite zugänglich sein. Zu jedem Penetrationsexperiment erfolgte die Durchführung eines entsprechenden Kontrollexperimentes ohne Wärmeapplikation.

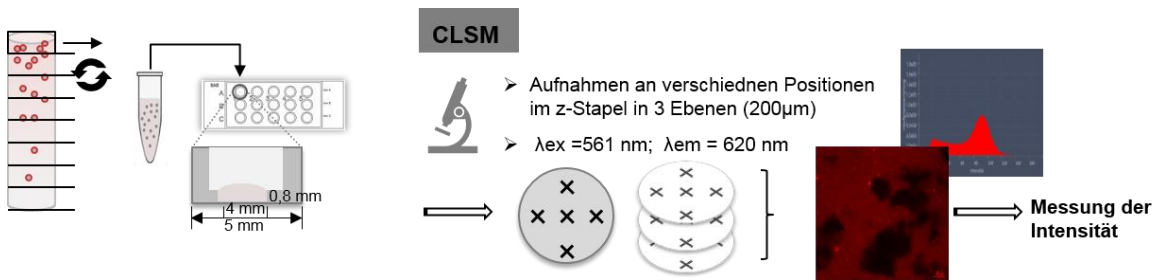


Abbildung 21: Vorgehensweise und Probenpräparation zur Untersuchung des Partikelpenetrationsmusters am CLSM. Der Inhalt der aufgetauten Schnitte wird in die Probenkammer überführt und anschließend am CLSM analysiert. Hierfür wird der Boden der Probenkammer fokussiert und anschließend an unterschiedlichen Positionen in der Probe ein z-Stapel von Bildern aufgenommen. Diese werden hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität analysiert. Wiederholt man diesen Prozess mit allen Schnitten erhält man eine Information über das Penetrationsmuster der Partikel.

2.3.3.2 Einfluss von Wärme auf die Partikelpenetration in HEC und Mukus

Die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese geht davon aus, dass sich die Partikelmigration im Mukus über eine lokale Viskositätserniedrigung erleichtern lässt. Diese Viskositätserniedrigung soll, so die Idee, über die induktive Partikelerwärmung erreicht werden. Mit dem im vorherigen Kapitel vorgestellten Set-up wurde ein erster grundsätzlicher Machbarkeitsnachweis für diese Hypothese angestrebt. In dieser ersten Studie sollte zunächst der generelle Einfluss von Wärme auf das Penetrationsverhalten von Partikeln untersucht werden.

Die Untersuchung dieses postulierten Zusammenhangs erfolgte in einem ersten Schritt unter Verwendung des Mukusmodell-Gels HEC. Dieses wurde hierzu luftblasenfrei in ein zuvor zugeschnittenes Schlauchstück überführt. Die untere Schlauchöffnung wurde mit Parafilm abgedichtet. Das 4 cm lange Schlauchstück wurde bis zu einer Markierung bei 3,5 cm mit dem HEC-Gel befüllt. Auf die Gel-Schicht wurden 60 µl der in Wasser dispergiert vorliegenden Magnetit-RhoBPLGA-NP aufgegeben. Anschließend wurde das obere Ende des Schlauchs ebenfalls mit Parafilm versiegelt und das Schlauchstück vertikal in eine entsprechende Halterung eingebracht. Für die Untersuchung des Einflusses von Wärme auf die Partikelmigration wurden die Schlauchstücke für 30 min einer Temperatur von 40 °C ausgesetzt. Diese Inkubation erfolgte in einem Trockenschrank. Als Kontrolle wurden auf diese Weise präparierte Schlauchstücke lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Nach Ablauf der Erwärmungszeit wurden die Schlauchstücke bei -80 °C eingefroren. Für die Detektion der Partikelpenetration wurde, wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben, das Schlauchstück in 0,5 cm große Schnitte zerlegt. Von den resultierenden acht Schnitten wurden anschließend am CLSM mikroskopische Aufnahmen angefertigt und deren Intensität gemessen. Bei jedem Schnitt wurden von fünf Positionen ausgehend drei Schnitte in einem Abstand von 100 µm senkrecht zur Probennormalen (z-Achse) aufgenommen. Insgesamt standen somit pro Schnitt 15 Aufnahmen zur Intensitätsmessung zur Verfügung.

In einem zweiten Schritt wurde dieses Experiment unter Verwendung von natürlichem Mukus, wiederholt. Bei dem verwendeten Mukus handelt es sich um respiratorischen Mukus der

im Rahmen einer Bronchoskopie an Pferden erhalten wurde (Pferdeklinik Altforweiler, Überherrn-Altforweiler). Das erhaltene, bis dahin bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Mukusmaterial enthielt z. T. Pufferlösungen, mit denen es von dem Bronchoskopie-Besteck gespült wurde. Zur Entfernung dieser Pufferlösungen und aufgrund von zu geringem Probenmaterial wurden die erhaltenen Proben gepoolt und zentrifugiert ($5000 \times g$, 10 min). Das zurückbleibende aufgereinigte Mukusmaterial wurde im Anschluss für die Experimente verwendet.

Die Durchführung der Penetrationsexperimente unter Verwendung von Mukus erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen Penetrationsexperimenten mit HEC-Gel. Die einzige Ausnahme davon bildet die Anzahl der am CLSM aufgenommenen Bilder pro Schlauchschnitt. Im Rahmen der Untersuchung wurden anstatt an 5 an 10 Positionen Aufnahmen generiert. Die Aufnahmen der obersten Ebene ($z = 3$) wurden hier jedoch nicht zur Intensitätsauswertung herangezogen. Begründet liegt dies in der Beobachtung, dass sich der Inhalt eines Schlauchstückes im Falle des Penetrationsexperimentes mit Mukus aufgrund seiner Konsistenz schwieriger in die Probenkammer überführen lässt. Dies bedingt eine ungleichmäßige Füllung der Probenkammer. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass beim letzten virtuellen Schnitt, d. h. der Aufnahmen der obersten Ebene ($z = 3$) an einer Position in der Probenkammer gar keine Probe ist. Daher beläuft sich die zur Auswertung herangezogene Anzahl pro Schnitt auf 20 anstatt 15 Aufnahmen.

2.3.3.3 Partikelpenetration unter induktiven Heizbedingungen

Im Hinblick auf das in dieser Arbeit verfolgte neuartige Konzept zur Überwindung der Mukusbarriere, stellt die Untersuchung der Partikelpenetration unter induktiven Heizbedingungen der finale Schritt dar. Um den potentiellen Effekt der induktiven Erwärmung auf das Penetrationsverhalten zu untersuchen, wurde der gleiche Versuchsaufbau gewählt, wie zuvor bei der grundsätzlichen Untersuchung von Wärme auf die Partikelmigration (vgl. 2.3.3.2). Die Untersuchung wurde darüber hinaus ebenfalls zunächst an HEC-Gel und danach an nativem Pferdemukus vorgenommen.

Hierzu wurde das Schlauchstück zunächst mit HEC, respektive Mukus gefüllt, bevor die fluoreszierenden Magnetit-PLGA-NP aufgegeben wurden. Für die Untersuchung der Partikelpenetration unter *in situ* Bedingungen wurde dieses Schlauchstück in die Spule bzw. in die sich darin befindliche Vakuumkammer eingebracht. Anschließend wurden die Partikel zu Erwärmungszwecken und damit zur postulierten Beeinflussung der Penetration im Modellgel bzw. Mukus für 30 min einer Heizleistung von 2,3 kW (60V52A) ausgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Schlauchstücke, wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, geschnitten und die einzelnen Schnitte zur Detektion der Partikelpenetration via CLSM-Aufnahmen nach Fluoreszenzintensität ausgewertet. Anzumerken ist, dass im Rahmen dieser Untersuchung neben dem standardmäßigen 1%igem Modellgel HEC auch Gele mit 5% bzw. 10%igen HEC-Anteil genutzt wurden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Herstellung von magnetischen Nanokompositen

3.1.1 Magnetit-PLGA-Nanopartikel

Für die Herstellung der angedachten magnetischen Kompositpartikel auf Basis des Polymers PLGA und den darin inkorporiert vorliegenden Magnetit-NP wurde auf die Nanopräzipitationsmethode zurückgegriffen. Im Zuge der Methodenentwicklung konnte ein Protokoll etabliert werden, welches die Herstellung derartiger Partikel ermöglicht.

Die in Abbildung 22 repräsentativ ausgewählten raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass sich unter dem hier etablierten Protokoll sphärische Partikel mit einer Größe von ca. 200 nm herstellen lassen. Dabei entsprechen die kleinen schwarzen Punkte in der gezeigten TEM-Aufnahme den in die PLGA-Matrix inkorporierten 10 nm großen Magnetit-NP. Demnach liegen die Magnetit-NP homogen verteilt und nicht agglomeriert in der Polymer-Matrix vor (siehe Abbildung 22 B). Die in der hochaufgelösten TEM-Aufnahme C des Magnetit-NP zu erkennenden Gitterebenen indizieren monokristalline Partikel. Die hier gezeigten Magnetit-beladenen Partikel wurden unter Verwendung von 25 mg PLGA und einer eingesetzten Menge von 1 mg Magnetit-NP hergestellt – den im Rahmen der Methodenentwicklung als „Standard“ etablierten und definierten Herstellungsparametern.

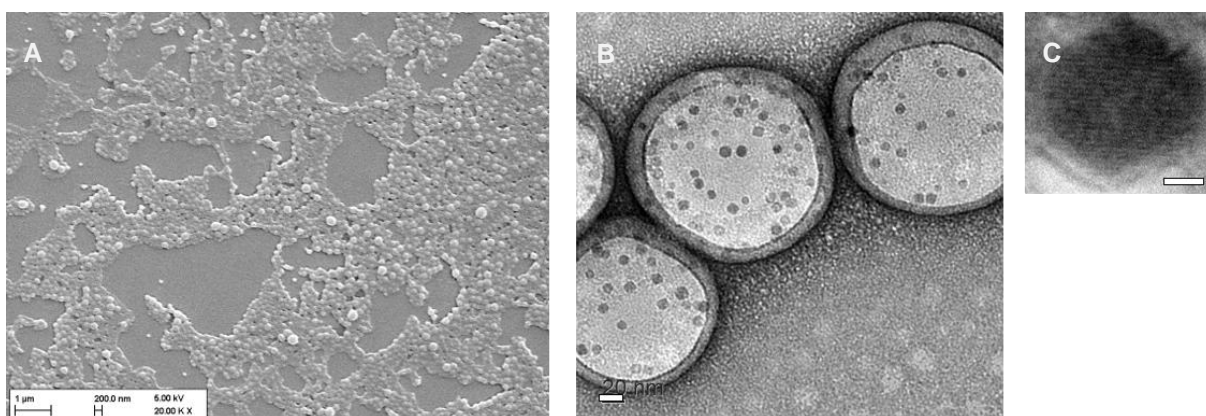


Abbildung 22: SEM-Aufnahme (A) und TEM-Aufnahme (B) von Magnetit-PLGA-NP sowie eine TEM-Aufnahme von den inkorporierten Magnetit-NP in Hochoauflösung (C). Der Maßstabsbalken in B entspricht 20 nm und in C 2 nm. In dem in C abgebildeten Magnetit-NP sind deutlich die durchlaufenden Gitterebenen zu erkennen, die auf dessen monokristallinen Charakter schließen lassen.

Die magnetische Charakterisierung dieser Partikel wurde mittels VSM unter Raumtemperatur vorgenommen. Hierdurch sollte geklärt werden, inwieweit die magnetischen

Kompositpartikel für die angedachte Applikation prinzipiell geeignet sind und ein superparamagnetisches Verhalten zeigen. Hierfür wurden das Ausgangsmaterial, d. h. die magnetischen Magnetit-NP, sowie die daraus hergestellten magnetischen Kompositpartikel untersucht. Die erhaltenen Magnetisierungskurven, dargestellt in Abbildung 23, zeigen sowohl für die Magnetit-NP als auch für die Kompositpartikel einen sigmoidalen und somit superparamagnetischen Verlauf. Eine Hystereseschleife ist in beiden Fällen nicht zu erkennen. Folglich weisen die Partikel keine Remanenz auf. Dies bedeutet, dass keine Restmagnetisierung in den Partikeln verbleibt, wenn das Magnetfeld entfernt wird. Eine magnetisch induzierte Agglomeration ist somit auszuschließen was für eine potentielle biomedizinische Anwendung *in vivo* ein wichtiger Aspekt darstellt.

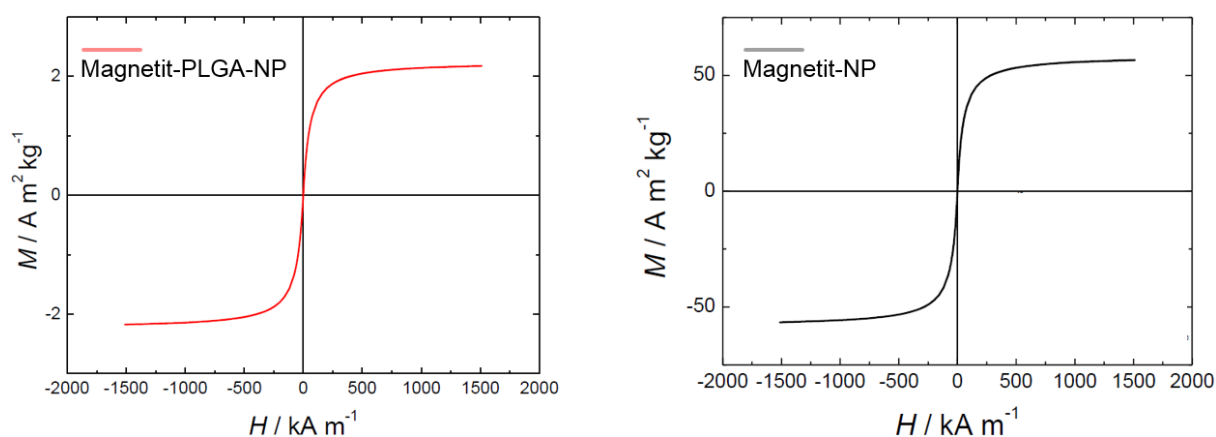


Abbildung 23: Magnetisierungskurve von Magnetit-PLGA-NP (links) und Magnetit-NP (rechts) aufgenommen bei Raumtemperatur.

Basierend auf den beiden gezeigten Magnetisierungskurven wurden weitere Parameter abgeleitet, die zur magnetischen Charakterisierung der Partikel herangezogen werden können. Für die Magnetit-NP wurde ausgehend von der Magnetisierungskurve eine Sättigungsmagnetisierung von $M_s = 58,00 \text{ Am}^2 \text{ kg}^{-1}$ ermittelt. Damit liegt dieser Wert in einem für superparamagnetische Eisenoxidpartikel ähnlicher Größe vergleichbaren Bereich.^[136, 137] Gegenüber dem bekannten Bereich des Bulk-Materials Eisenoxid ($M_s = 92 - 96 \text{ emu/g}$) bleibt der hier ermittelte Wert der Sättigungsmagnetisierung zurück. Er liegt eher im Bereich der Sättigungsmagnetisierung von $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Festkörpern ($M_s = 60 - 80 \text{ emu/g}$)^[138, 139]. Die vergleichsweise niedrige Sättigungsmagnetisierung der Kompositpartikel mit $2,24 \text{ Am}^2 \text{ kg}^{-1}$ erklärt sich dadurch, dass die Sättigungsmagnetisierung auf die Masse normiert ist. Ausgehend davon ist zu erwarten, dass die Sättigungsmagnetisierung sinkt, wenn ein Hybrid aus ferromagnetischem und nicht ferromagnetischem Material vorliegt. Eine bestimmte Masse an Kompositpartikel enthält, verglichen mit der gleichen Masse an Magnetit-NP, weniger magnetisches Material. Folglich ist die Sättigungsmagnetisierung niedriger. Dieses Phänomen ist bereits in der Literatur für derartige Hybridpartikel beschrieben.^[112, 140, 141]

Ausgehend von der Sättigungsmagnetisierung wurde der Gehalt an magnetischem Material μ_{mag} in den beiden Partikeltypen bestimmt. Für die Magnetit-NP beträgt dieser 62,84% und für die magnetischen Kompositpartikel 2,40%. Dass der magnetische Gehalt der Magnetit-NP nicht 100% entspricht war zu erwarten. Dies lässt sich beispielsweise mit der Oberflächenhydrophobisierung dieser Partikel unter Verwendung der Ölsäure begründen. Zudem besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass ein Teil des Eisens möglicherweise nicht als Magnetit vorliegt. Um Aufschluss darüber zu erhalten wären Methoden wie XRD oder die Mößbauerspektroskopie heranzuziehen, bei denen die Kristallstruktur genauer betrachtet wird. Die Sättigungsmagnetisierung alleine lässt diesbezüglich keine Rückschlüsse zu. Der magnetische Anteil der Kompositpartikel ist erwartungsgemäß niedriger als der der reinen Magnetit-NP. Dies liegt darin begründet, dass die Magnetit-NP im Falle der Kompositpartikel in der Polymermatrix eingebettet vorliegen. Der magnetische Gehalt der Kompositpartikel korreliert mit deren Magnetit-Beladung. Diese Beladung wurde in der vorliegenden Arbeit mittels HR-CS-AAS, eine spezielle Variante der Atomabsorptionsspektrometrie, bestimmt. Sie liegt, soviel sei an dieser Stelle den nachstehenden Ergebnissen vorweggegriffen, mit ca. 2% in der Größenordnung des ermittelten magnetischen Gehalts der hier charakterisierten Kompositpartikel. Darüber hinaus wurde ausgehend von den Magnetisierungskurven die magnetische Partikelgröße d_{mag} für beide Partikeltypen bestimmt. Diese liegen mit ~ 8 nm zwar leicht unterhalb der mittels DLS und TEM charakterisierten Größe von 10 nm aber in einer vergleichbaren Größenordnung. Bezugnehmend auf die magnetische Charakterisierung mittels VSM lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass die unter dem etablierten Standardprotokoll hergestellten Kompositpartikel superparamagnetisch und somit zur induktiven Erwärmung grundsätzlich befähigt sind.

Im Rahmen der zu Beginn dieses Kapitels angesprochenen anfänglichen Methodenentwicklung wurde der Einfluss unterschiedlicher Mengen an Magnetit-NP zur Herstellung der magnetischen Kompositpartikel näher untersucht. Dabei lag das Augenmerk der Evaluierung auf der Beeinflussung der resultierenden Beladung und Einkapselungseffizienz, der Homogenität der Verkapselung aber auch auf der Größe und Größenverteilung. Im Zuge dessen wurden Magnetit-beladene PLGA-NP unter Verwendung von 35 μl , 50 μl und 85 μl der in CHCl_3 dispergiert vorliegenden Magnetit-NP (d. h. 0,7 mg, 1,0 mg und 1,7 mg Magnetit-NP) hergestellt. Die Menge an PLGA und alle weiteren prozessrelevanten Parameter, wie beispielsweise Art und Menge des Solvent oder Stabilisators, wurden hingegen konstant gehalten. Die Evaluierung wurde zunächst mit den Magnetit-NP der Bezugsquelle 1 (Bq. 1) vorgenommen und im weiteren Verlauf der Arbeit mit den Magnetit-NP der Bezugsquelle 2 (Bq. 2) wiederholt. Hierdurch sollte die Herstellungsmethode unter Verwendung dieser Magnetit-NP validiert werden. Der Gehalt an Eisenoxid in den magnetischen Kompositpartikeln wurde mit Hilfe von ICP-MS (Bq. 1) bzw. HR-CS GF-AAS (Bq. 2) und unter Verwendung der entsprechenden, in Kapitel 2.3.1.6 eingeführten Formeln, bestimmt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind für die Magnetit-NP beider Bezugsquellen hinsichtlich Beladung und

Einkapselungseffizienz in Tabelle 4 zusammengefasst. Demnach erhöht sich mit steigender Menge an eingesetzten Magnetit-NP die Eisenoxid-Beladung der Kompositpartikel. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Einkapselungseffizienz, so ist ein ähnlicher Trend zu beobachten.

Tabelle 4: Beladung und Einkapselungseffizienz in Abhängigkeit der zur Kompositpartikelherstellung eingesetzten initialen Menge an Magnetit-NP. Dabei sind die Ergebnisse der Partikelherstellung unter Verwendung der in CHCl_3 vorliegenden 10 nm großen Magnetit-NP der Bezugsquelle 1 und 2 gegenübergestellt ($n = 3$). Die dargestellten Kennzahlen basieren auf den ermittelten Eisenkonzentrationen die für Bq. 1 unter Verwendung der ICP-MS und für Bq. 2 unter Verwendung der HR-CS GF-AAS erhalten wurden.

Ansatz	Magnetit-NP	Beladung (%)		Einkapselungseffizienz (%)	
		Bq. 1	Bq. 2	Bq. 1	Bq. 2
A	0,7	$0,78 \pm 0,06$	$0,82 \pm 0,15$	$27,53 \pm 3,57$	$33,83 \pm 6,38$
B	1	$1,03 \pm 0,08$	$1,70 \pm 0,27$	$23,01 \pm 0,63$	$47,26 \pm 8,48$
C	1,7	$1,74 \pm 0,01$	$3,42 \pm 0,17$	$28,65 \pm 0,41$	$54,41 \pm 3,20$

Die hier aufgezeigten Tendenzen hinsichtlich Beladung und Einkapselungseffizienz gelten für die Magnetit-NP beider Bezugsquellen gleichermaßen. Dies war auch zu erwarten, da die Magnetit-NP nach demselben Herstellungsprotokoll ^[115] synthetisiert wurden, beide an ihrer Oberfläche mit Ölsäure funktionalisiert sind und eine Größe von 10 nm aufweisen. Lediglich die Bezugsquelle, d. h. der Hersteller dieser Partikel, unterscheidet sich. Betrachtet man die Beladung und Einkapselungseffizienz der hergestellten Kompositpartikel genauer fällt auf, dass die Magnetit-NP der Bezugsquelle 2 ein leicht besseres Verkapselungsprofil aufweisen. Eine mögliche Erklärung wäre ein leicht hydrophoberer Charakter dieser Magnetit-Partikel, wodurch sie besser in das hydrophobe Polymer PLGA eingebettet werden können. Unabhängig davon zeigen die erhalten Ergebnisse, dass sich die Beladung der Kompositpartikel über die eingesetzte Menge an Magnetit-NP beeinflussen lässt. Ein wichtiger Aspekt, um beispielsweise die magnetischen Charakteristika der Kompositpartikel zu ändern. So ließe sich darüber z. B. die Sättigungsmagnetisierung der Partikel entsprechend variieren. Dies könnte für die spätere Applikation und die beabsichtigte induktive Erwärmung dieser Kompositpartikel von Interesse sein. Zudem zwischen der Sättigungsmagnetisierung und der induktiven Erwärmbarkeit von Eisenoxidpartikel ein entsprechender Zusammenhang beschrieben ist ^[142].

Den Einfluss der eingesetzten Magnetit-NP auf die resultierende Verkapselung dieser NPs in die PLGA-Matrix wurde zusätzlich mittels TEM näher untersucht. Im Zuge dieser Untersuchung wurde die Anzahl an verkapselten Magnetit-NP in den magnetischen Kompositpartikeln bestimmt. Dies erfolgte durch manuelles Auszählen der Magnetit-NP pro Kompositpartikel, wobei die Auszählungsbasis mindestens 100 Kompositpartikel entsprach. Der

prozentuale Anteil der jeweiligen Partikelfraktion in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Magnetit-NP ist in Abbildung 24 graphisch gegenübergestellt. Bei 50 Magnetit-NP pro Kompositpartikel wurde eine Auszählgrenze gesetzt, da eine fehlerfreie Auszählung von Magnetit-NP, die diese Anzahl übersteigt nicht mehr möglich ist. Betrachtet man die einzelnen Fraktionen ist deutlich zu erkennen, dass sich diese mit steigender Menge an eingesetzten Magnetit-NP verändern. Die Anzahl an Magnetit-NP pro Kompositpartikel erhöht sich, sprich die Beladung der Kompositpartikel nimmt zu. Besonders deutlich wird dies wenn man die Fraktion mit mehr als 50 Magnetit-NP pro Kompositpartikel betrachtet. Unter Verwendung der geringsten Menge an Magnetit-NP (vgl. Abbildung 24A) werden derart stark beladene Kompositpartikel quasi gar nicht erhalten. Bei der höchsten Menge an eingesetztem Magnetit macht diese Fraktion hingegen knapp 50% der erhaltenen Kompositpartikel aus (vgl. Abbildung 24C). Die transmissionsmikroskopische Untersuchung verifiziert somit die Ergebnisse der vorherigen Eisenoxidbestimmung. Zudem belegt diese Untersuchung, dass die Magnetit-NP in sämtlichen hier getesteten Mengenverhältnissen in der PLGA-Matrix als einzelne Partikel in der Polymermatrix vorliegen. Es ist keine Agglomeration dieser Magnetit-NP zu beobachten. Eine Einflussnahme der eingesetzten Menge an Magnetit-NP auf die resultierende Magnetit-Beladung, wie sie hier gezeigt werden konnte, ist in der Literatur auch für andere Magnetit-basierte Kompositpartikel beschrieben.^[143] Daher war das hier beobachtete Verhalten gewissermaßen zu erwarten.

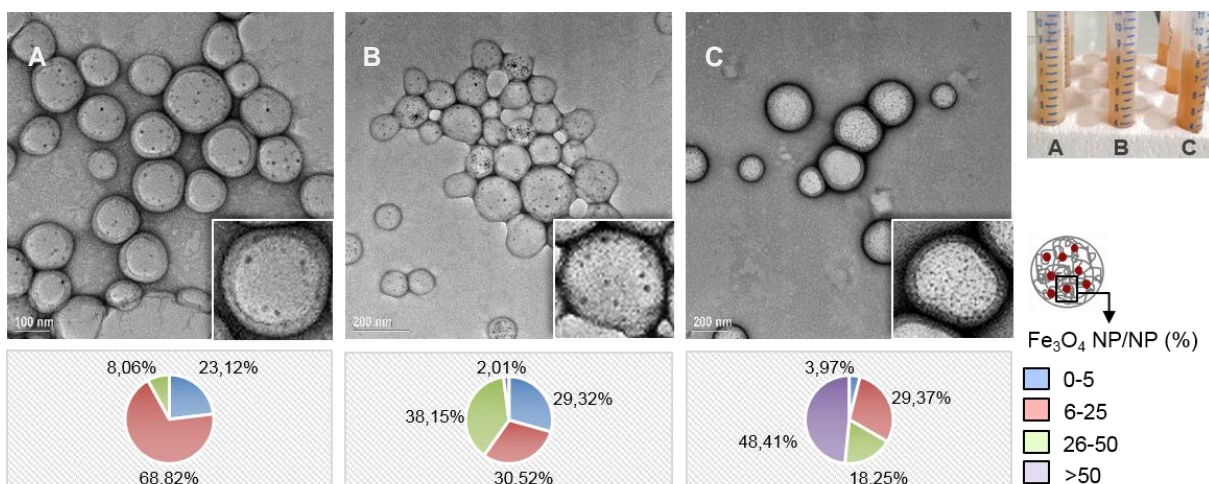


Abbildung 24: Ergebnis der TEM-Bild basierten Untersuchung hinsichtlich des Einflusses der eingesetzten Magnetit-NP auf die resultierende Verkapselung dieser NP in die PLGA-Matrix. Die TEM-Aufnahmen A, B, C mit entsprechender Ausschnittvergrößerung zeigen magnetische Kompositpartikel, die unter Verwendung von 0,7 mg, 1,0 mg und 1,7 mg Magnetit-NP hergestellt wurden. Die hergestellten Partikelformulierungen sind photographisch dargestellt. Zur Bestimmung der prozentualen Anzahl an Fe_3O_4 -NP pro Kompositnanopartikel wurden mindestens 100 magnetische Kompositpartikel ausgezählt.

Neben der Beladung und Einkapselungseffizienz wurden zudem die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Magnetit-NP untersucht. In der untenstehenden Tabelle 5 sind die diesbezüglich erhaltenen Ergebnisse der DLS-

Messungen gezeigt. Daraus geht hervor, dass die Erhöhung der zur Herstellung verwendeten Menge an Magnetit-NP die resultierende Größe und Größenverteilung der Kompositpartikel minimal zu beeinflussen scheint. Tendenziell nehmen die Größe sowie die Größenverteilung mit steigender Menge an Magnetit-NP leicht zu. Ungeachtet dessen werden, basierend auf einem PDI von 0,162, auch unter der höchsten Menge an Magnetit-NP noch monodisperse Kompositpartikel erhalten. Inwieweit sich, beispielsweise zur Erhöhung der Magnetit-Beladung, diese Menge an Magnetit-NP steigern lässt, um noch eine für die Indikation geeignete Größe und Größenverteilung der Kompositpartikel zu erhalten, bleibt zu untersuchen.

Tabelle 5: Partikelgröße und PDI magnetischer Kompositpartikel in Abhängigkeit der zur deren Herstellung eingesetzten Menge an Magnetit-NP. Die Partikel wurden unter Verwendung von 0,7 mg, 1,0 mg und 1,7 mg Magnetit-NP via Nanopräzipitation unter dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll hergestellt ($n = 3$).

Ansatz	Magnetit-NP initial [mg]	Größe [nm]	PDI
A	0,7	$182,69 \pm 2,04$	$0,030 \pm 0,016$
B	1,0	$188,43 \pm 5,63$	$0,031 \pm 0,015$
C	1,7	$224,57 \pm 8,02$	$0,162 \pm 0,035$

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich unter den hier getesteten und eingesetzten Mengen an Magnetit-NP sphärische, magnetische Kompositpartikel in einem Größenbereich von ca. 200 ± 20 nm herstellen lassen. Dabei wird insbesondere die Beladung, aber auch die Größe und Größenverteilung der resultierenden Kompositpartikel über die eingesetzte Menge an Magnetit-NP beeinflusst. Die Kenntnis darüber könnte für eine Optimierung hinsichtlich der magnetischen Eigenschaften oder vor dem Hintergrund einer zusätzlichen Verkapselung mit einem Wirkstoff dienlich sein. Für das weitere experimentelle Vorgehen wurde sich in dieser Arbeit auf die mittlere der hier evaluierten Menge an Magnetit-NP zur Herstellung der magnetischen Kompositpartikel festgelegt. Dies entspricht $50 \mu\text{l}$ der in Chloroform dispergierten Magnetit-NP (20 mg/ml) respektive 1 mg Magnetit-NP. Darüber hinaus wurde sich außer bei der anfänglichen Etablierung der Herstellungsmethode unter Verwendung der Magnetit-NP der Bezugsquelle 1 auf die Magnetit-NP der Bezugsquelle 2 festgelegt. Diese Herstellungsparameter wurden entsprechend als „Standardprotokoll“ etabliert und definiert. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Kompositpartikel wurden, sofern nicht ausdrücklich angegeben, unter Verwendung exakt dieser Bedingungen hergestellt. Dass unter diesem Standardprotokoll Kompositpartikel mit den hier angestrebten superparamagnetischen Charakteristika resultieren, konnte zu Beginn dieses Kapitels gezeigt werden.

3.1.2 Magnetit-Rhodamin B PLGA-Nanopartikel

Die Herstellung von Magnetit-beladenen Rhodamin B PLGA-NP, d. h. fluoreszierender magnetischer Kompositpartikel, erfolgte nach dem in dieser Arbeit etablierten Standard-Herstellungsprotokoll für Magnetit-PLGA-NP unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem PLGA^[132, 133].

Diese magnetischen Kompositpartikel (RhoBPLGA) sind in den repräsentativ ausgewählten raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 25 gezeigt. Demnach lassen sich mittels RhoBPLGA in Bezug auf Größe und Morphologie vergleichbare Kompositpartikel herstellen. Die erhaltenen fluoreszierenden Kompositpartikel sind sphärisch und ca. 170 nm groß. Die Partikelgrößenverteilung ist sehr eng. Dies wird auch durch die in Tabelle 6 gezeigten Ergebnisse der DLS-Messung gestützt. Die inkorporierten Magnetit-NP sind homogen in der Polymermatrix verteilt und zeigen keine Agglomeration (siehe TEM-Aufnahme in Abbildung 25B).

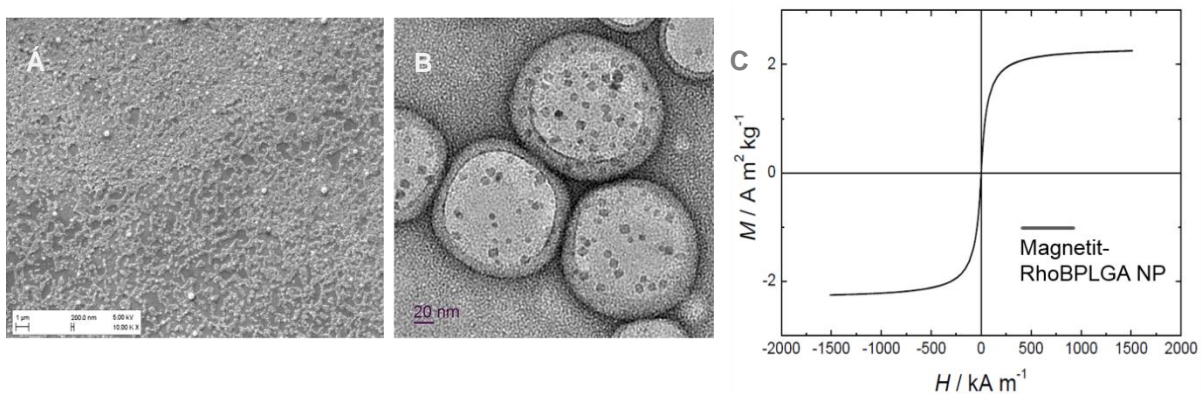


Abbildung 25: Dargestellt ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (A) und eine transmissionselektronische Aufnahme (B) von Magnetit-RhoBPLGA-NP sowie das Ergebnis der VSM Messung dieser Partikel (C).

Tabelle 6: Partikelgröße und PDI von Magnetit-RhoBPLGA-NP sowie die zugehörige Beladung und Einkapselungseffizienz von Magnetit-NP (n = 3).

Größe [nm]	PDI	Beladung (%)	Einkapselungseffizienz (%)
$170,41 \pm 6,91$	$0,027 \pm 0,018$	$2,06 \pm 0,70$	$48,30 \pm 0,70$

Bezüglich der Beladung und Einkapselungseffizienz der zu verkapselnden Magnetit-NP wurden mit ca. 2% und 48% ebenfalls vergleichbare Werte zu den Magnetit-beladenen PLGA-NP erzielt (vgl. Tabelle 6 mit Tabelle 5, Ansatz B). Diese beiden Kenngrößen wurden auf Basis der Eisenoxidbestimmung mittels HR-CS-AAS erhalten. Die magnetischen Eigenschaften der hergestellten fluoreszierenden Kompositpartikel wurden mittels VSM bei Raumtemperatur charakterisiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Form der erhaltenen Magnetisierungskurve in Abbildung 25C dargestellt. Der sigmoidale Verlauf dieser

Magnetisierungskurve spricht für ein superparamagnetisches Verhalten der fluoreszierenden magnetischen Kompositpartikel. Hysterese und Remanenz sind nicht zu beobachten. Anhand dieser VSM-Messung und den erzielten Ergebnissen aus den VSM-Messungen reiner Magnetit-NP, konnte darüber hinaus die Sättigungsmagnetisierung M_s , die Größe des magnetischen Kerns d_{mag} sowie der magnetische Gehalt μ_{mag} der Kompositpartikel bestimmt werden. Die Sättigungsmagnetisierung ist mit $2,32 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$ im Vergleich zu reinen Magnetit-NP mit $58,0 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$ wesentlich geringer. Da die Sättigungsmagnetisierung auf die Masse normiert ist, ist zu erwarten, dass diese sinkt, wenn ein Hybrid, wie die Kompositpartikel aus ferromagnetischem und nicht ferromagnetischem Material, vorliegt. Das gleiche Phänomen war auch schon bei den im vorherigen Kapitel gezeigten Magnetit-PLGA-NP zu beobachten und wird an dieser Stelle nicht weiter diskutiert. Auf Basis der Sättigungsmagnetisierung wurde auch der magnetische Gehalt der Kompositpartikel bestimmt. Mit einem Massenprozentanteil von 2,51% liegt der magnetische Gehalt in einem mit der Magnetit-Beladung vergleichbaren Größenbereich (vgl. Beladungswert in Tabelle 6). Die magnetischen Kerne wurden mit 7,9 nm bestimmt, was ähnlich zu der im TEM ermittelten Größe von 10 nm für die Magnetit-NP ist. Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass durch Verwendung dieses PLGA-Typs Kompositpartikel resultieren, welche hinsichtlich Morphologie, Größe und Größenverteilung mit den Magnetit-PLGA-NP vergleichbar sind. Dies stellt zugleich die Grundvoraussetzung dar, um diese Partikel als Äquivalent für die ungelabelten Kompositpartikel in der weiteren experimentellen Vorgehensweise nutzen zu können.

3.1.3 Co-Verkapselung von Ciprofloxacin

Die Herstellung magnetischer, mit Ciprofloxacin co-beladener Kompositpartikel, erfolgte auf Basis des in dieser Arbeit etablierten Standard-Herstellungsprotokolls. Aufgrund der Co-Verkapselung mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin und dessen schlechter Löslichkeit in Aceton, musste dieses Protokoll jedoch entsprechend adaptiert werden. Die grundlegende Idee hinter der Co-Verkapselung mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin war die Entwicklung eines Stimulus-responsiven Trägersystems zur Behandlung von *Pseudomonas aeruginosa* verursachten chronischen Lungeninfektionen bei ZF-Patienten. Die angedachte Wirkstofffreisetzung sollte hierbei thermoresponsiv infolge der induktiven Partikelerwärmung erfolgen. In Hinblick darauf wurde der Einfluss unterschiedlicher Mengen an Magnetit-NP auf die Partikelbildung und insbesondere Co-Verkapselung von Ciprofloxacin untersucht. Die Magnetit-NP repräsentieren hierbei den für den Stimulus essentiellen Bestandteil des Trägersystems. Basierend auf den DLS Messungen gilt es zunächst festzuhalten, dass unter den hier getesteten Mengen an Magnetit-NP für alle Ansätze nanoskalige Partikel mit einer Größe von ca. 200 nm erhalten wurden (siehe Tabelle 7).

Betrachtet man die resultierende Partikelgröße in Abhängigkeit der zur Herstellung eingesetzten Menge an Magnetit-NP, zeichnet sich eine Verringerung der Größe mit zunehmender Menge an Magnetit-NP ab. Die gleiche Tendenz ist für die Partikelgrößenverteilung,

ausgedrückt durch den PDI, zu beobachten. Bei der geringsten Menge an Magnetit-NP (\triangleq Ansatz b1) resultieren Partikel mit einem PDI von ca. 0,163, wohingegen dieser PDI bei der höchsten Menge an Magnetit-NP (\triangleq Ansatz b3) auf 0,026 abfällt.

Tabelle 7: Partikelgröße und PDI in Abhängigkeit der zur Herstellung der Cipro co-beladenen magnetischen Kompositpartikel eingesetzten Menge an Fe_3O_4 -NP mit b0 = 0 mg, b1= 0,7 mg, b2= 1 mg, b3= 1,7 mg. Die eingesetzte Ciprofloxacine-Menge betrug in allen Ansätzen 2,5 mg und die PLGA-Menge 25 mg (n = 3).

Ansatz	Magnetite-NP initial [mg]	Größe [nm]	PDI
b0	0	$211,68 \pm 63,63$	$0,113 \pm 0,070$
b1	0,7	$233,04 \pm 35,39$	$0,163 \pm 0,090$
b2	1	$200,84 \pm 41,79$	$0,090 \pm 0,094$
b3	1,7	$172,91 \pm 2,64$	$0,026 \pm 0,015$

Das Ergebnis der Untersuchung zum Einfluss der eingesetzten Magnetit-Menge auf die Co-Verkapselung von Ciprofloxacine ist in Abbildung 26 graphisch dargestellt. Die darin für den jeweiligen Ansatz gezeigte Beladung und Einkapselungseffizienz für Ciprofloxacine wurde auf Grundlage der HPLC-Analyse ermittelt. In Kapitel 2.3.1.6 ist der hierfür angewandte Berechnungsweg dargelegt.

Betrachtet man die Wirkstoffbeladung und Einkapselungseffizienz für Ciprofloxacine ist festzustellen, dass beide Kennzahlen mit Erhöhung der zur Partikelherstellung eingesetzten Menge an Magnetit-NP kleiner werden. Diese Beobachtung korreliert demnach mit der bereits beschriebenen sinkenden Partikelgröße und -größenverteilung bei Erhöhung der eingesetzten Magnetit-NP. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen scheint die eingesetzte Menge an Magnetit-NP sowohl die Co-Verkapselung von Ciprofloxacine als auch die resultierende Partikelgröße zu beeinflussen. Ein Sachverhalt, welcher gewissermaßen zu erwarten war.

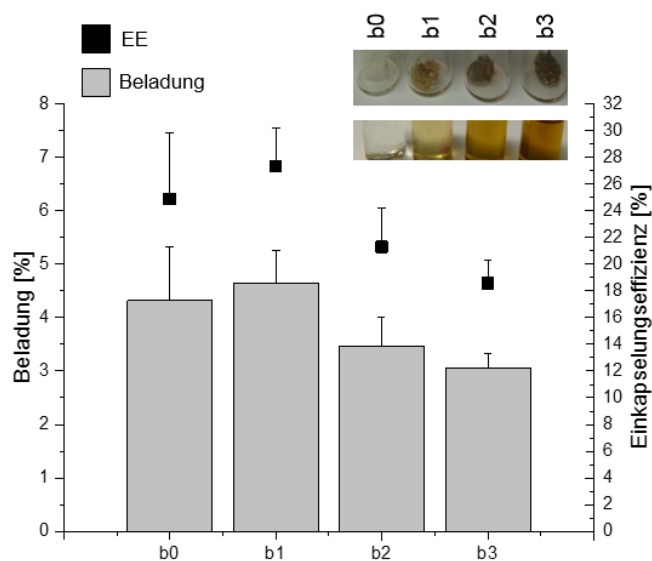


Abbildung 26: Beladung und Einkapselungseffizienz von Ciprofloxacin in Abhängigkeit der zur Herstellung der co-beladenen magnetischen Kompositpartikel eingesetzten Menge an Fe₃O₄-NP mit b0 = 0 mg, b1 = 0,7 mg, b2 = 1 mg, b3 = 1,7 mg. Die eingesetzte Cipro- und PLGA-Menge wurde dabei konstant gehalten. Zudem ist eine fotografische Aufnahme der zur Ciprofloxacin-Beladungsbestimmung herangezogenen gefriergetrockneten Partikel vor und nach deren Auflösung gezeigt. Die zunehmende Braunfärbung von links nach rechts korreliert dabei mit der eingesetzten Menge an Fe₃O₄-NPs (n = 3).

Bei einer Co-Beladung von Wirkstoff und Magnetit-NP konkurrieren beide Substanzen um eine Inkorporation in die Polymermatrix. Weist einer dieser beiden Cargos bestimmte Charakteristika auf, welche seine Verkapselung präferieren, wird dieser folglich zu einem höheren Maße inkorporiert. Bei einem hydrophoben Trägermaterial, wie dem hier verwendeten PLGA, könnte dies beispielsweise eine stärkere Hydrophobizität sein. Ein derartiges Verhalten ist beispielsweise für die Kobeladung von Magnetit-NP und den Wirkstoff Tetrandrin in PLGA beschrieben.^[112] Im angeführten Beispiel reduziert sich ebenfalls bei Erhöhung der Magnetit-NP die eingekapselte Wirkstoffmenge. Die Magnetit-NP scheinen demnach eine höhere Affinität zur Polymermatrix PLGA aufzuweisen als der Wirkstoff Tetrandrin.

Ein solcher Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit für die mit Ciprofloxacin co-beladenen Kompositpartikel jedoch nicht gefunden werden. Auf Basis der TEM-Aufnahmen der Partikel ist eine Erhöhung der Magnetit-Beladung als möglicher Grund für die beobachtbare sinkende Cipro-Beladung quasi auszuschließen. Betrachtet man die in Abbildung 27 repräsentativ ausgewählten TEM-Aufnahmen, so ist festzustellen, dass, unabhängig von der eingesetzten Menge an Magnetit-NP, eine sehr geringe Einkapselung dieser Partikel in die PLGA-Matrix stattfindet. Die abgebildeten, polymerbasierten Partikel enthalten nur sehr wenige oder z. T. auch gar keine Magnetit-NP. Die Magnetit-Beladung scheint mit Erhöhung der eingesetzten Menge an Magnetit-NP nur minimal anzusteigen. Von einer zusätzlichen Quantifizierung des Eisenoxidgehalts wurde an dieser Stelle abgesehen.

Eine weitere wichtige Beobachtung, welche die TEM-Untersuchung hervorbrachte, ist das Vorliegen agglomerierender Magnetit-NP. Dabei sind sowohl nicht verkapselte als auch in der Polymermatrix verkapselt vorliegende Agglomerate von Magnetit-NP zu erkennen (siehe Abbildung 27 A-2 und B).

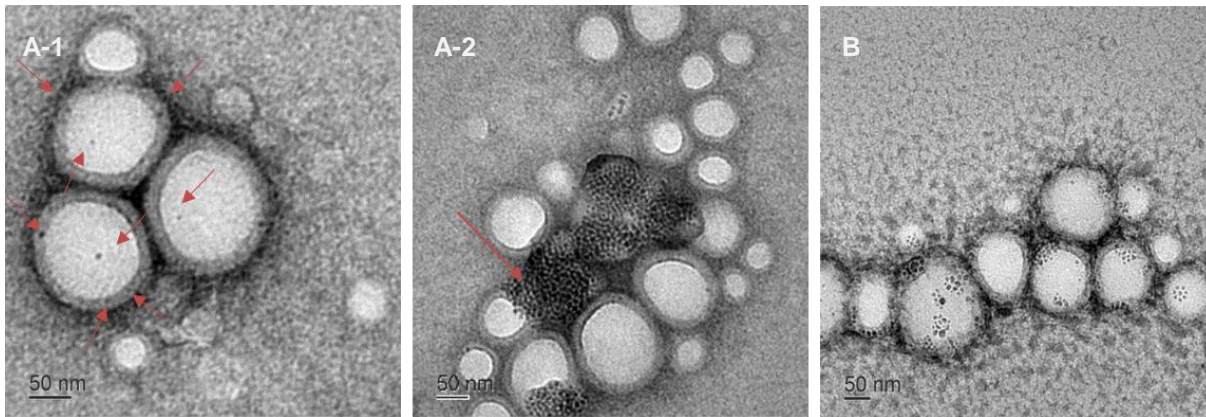


Abbildung 27: TEM-Aufnahmen der aus Ansatz b2 ($\hat{=}$ A-1 und A-2) und b3 ($\hat{=}$ B) resultierenden Ciprofloxacin co-beladenen Kompositpartikel. Die roten Pfeile in A-1 markieren die verkapselten Magnetit-NP in den Kompositpartikeln. In der TEM-Aufnahme A-2 sind nicht verkapselte Agglomerate von Magnetit-NP zu erkennen (roter Pfeil).

Das Vorhandensein dieser Agglomerate liefert eine mögliche Erklärung für die sinkende Beladung und Einkapselungseffizienz von Ciprofloxacin bei Erhöhung der zur Herstellung eingesetzten Menge an Magnetit-NP. Gleiches gilt für die Beeinflussung der Partikelgröße. Ein möglicher Erklärungsansatz an dieser Stelle könnte wie folgt lauten: Die an der Oberfläche der Magnetit-NP zur Stabilisierung aufgebrauchte Ölsäure könnte im Zuge der Kompositpartikelherstellung durch das Ciprofloxacin teilweise ausgetauscht worden sein. Hierdurch wären letztlich die Magnetit-NP instabiler und aufgrund des dann teilweise gebundenen Ciprofloxacins hydrophiler. Ein derartiger Ligandenaustausch und die damit einhergehende unerwünschte Oberflächenmodifikation der Magnetit-NP sind durchaus vorstellbar. Ciprofloxacin weist eine freie Carboxylgruppe auf, welche exakt der chemischen Gruppe entspricht, über die auch die Ölsäure an die Ferrit-Partikel adsorbiert. Demnach würden durch die Erhöhung der zur Partikelherstellung eingesetzten Menge an Magnetit-NP, bei gleichbleibender Ciprofloxacin-Konzentration, zunehmend mehr Wirkstoffmoleküle an die Oberfläche dieser Magnetit-NP adsorbieren. Dadurch sinkt die Anzahl der Wirkstoffmoleküle, die in die Polymermatrix inkorporiert werden können. Gleichzeitig sind die Magnetit-NP aufgrund dieses Ligandenaustauschs hydrophiler funktionalisiert, wodurch sie auch schlechter in die hydrophobe PLGA-Matrix inkorporiert werden können. Aufgrund dessen sinkt nicht nur die Beladung und Einkapselungseffizienz des Ciprofloxacins, sondern aufgrund der geringeren Inkorporation von Magnetit-NP und Ciprofloxacin auch die Partikelgröße.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Herstellung magnetischer, mit Ciprofloxacin co-beladener Kompositpartikel zwar prinzipiell möglich ist, jedoch optimiert werden muss. Inwieweit sich diese Kompositpartikel auf Basis des aktuellen Entwicklungsstands als induktiv heizbares Trägersystem zur Behandlung von *P. aeruginosa* verursachten chronischen Lungeninfektionen eignet, bleibt abzuklären. Die eingeschränkte Beladbarkeit mit Magnetit-NP, dem für den Stimulus essentielle Bestandteil dieses Trägersystems, könnte diesbezüglich ausschlaggebend sein. Es gilt daher zu untersuchen, inwieweit die Partikel induktiv heizbar oder dahingehend optimierbar sind. Hierfür wäre es interessant den angeführten Erklärungsansatz für die beobachtete geringe Kobeladung näher zu untersuchen. Unter Verwendung der CHN-Elementaranalyse könnte beispielsweise untersucht werden, inwieweit der Wirkstoff Ciprofloxacin die Tendenz aufweist, die Ölsäure auf der Oberfläche der Magnetit-NP zu verdrängen bzw. auszutauschen. Eine weitere Möglichkeit diesen postulierten Ligandenaustausch quantitativ zu untersuchen, wäre die Verwendung von radioaktiv gelabelter Ölsäure.^[144]

3.2 Induktives Heizen magnetischer Nanopartikel

3.2.1 Vorversuche zur Etablierung eines Setups zum induktiven Heizen

Hinsichtlich der induktiven Erwärmung der Kompositpartikel wurde ein Set-up benötigt, das neben dem eigentlichen Erwärmungsprozess auch die Messung einer Temperaturerhöhung störungsfrei und reproduzierbar ermöglicht. Vor diesem Hintergrund und dem Anspruch diese Erwärmung sowie deren messtechnische Erfassung unter möglichst adiabatischen Bedingungen durchzuführen, wurde die Entwicklung einer entsprechenden Probenkammer angestrebt. Hierfür wurden verschiedene Materialien auf ihre Isolationsfähigkeit getestet. Diese umfassten Luft, den Polyethylenschaum Tubolit[®], den synthetische Kautschukschaum Armaflex[®], den Schaumstoff auf Polystyrolbasis Neopor[®] sowie ein eigens dafür konstruiertes doppelwandiges Vakuum-Glasgefäß. In einer ersten Evaluierung wurden diese Materialien, bzw. daraus bestehende Probenkammern hinsichtlich ihrer Fähigkeit einem Energieverlust entgegenzuwirken, verglichen. Der Wärmeverlust an die Umgebung ist bei der induktiven Erwärmung ein wichtiger Parameter, der letztlich die messbare Erwärmung beeinflusst. Daher gilt es den Wärmeverlust entsprechend zu minimieren. Vor diesem Hintergrund wurde 50 °C temperiertes Wasser in den entsprechenden Isolator eingebracht und der Temperaturverlauf über die Zeit gemessen. Das Ergebnis dieser Evaluierung ist in Abbildung 28 dargestellt. Die darin dargestellten Temperaturprofile zeigen, dass keine der Probenkammern wirklich adiabatische Bedingungen gewährleisten kann. In allen getesteten Probenkammern nimmt die Temperatur über die Zeit ab. Der Temperaturabfall ist jedoch unterschiedlich hoch. Luft ist demnach das schlechteste der hier getesteten Isoliermaterialien, gefolgt von dem Polyethylenschaum Tubolit[®]. Vergleicht man Luft mit den Probenkammern aus Armaflex[®], Neopor[®] und der hier entwickelten Vakuumkammer ist ein extrem starker Temperaturabfall zu beobachten.

Innerhalb von ca. 10 min fällt die Probentemperatur um die Hälfte ab. Luft als alleiniger Isolator stellte somit keine Option dar. Der über die Zeit gemessene Wärmeverlust der drei anderen Isolatoren ist nahezu gleich.

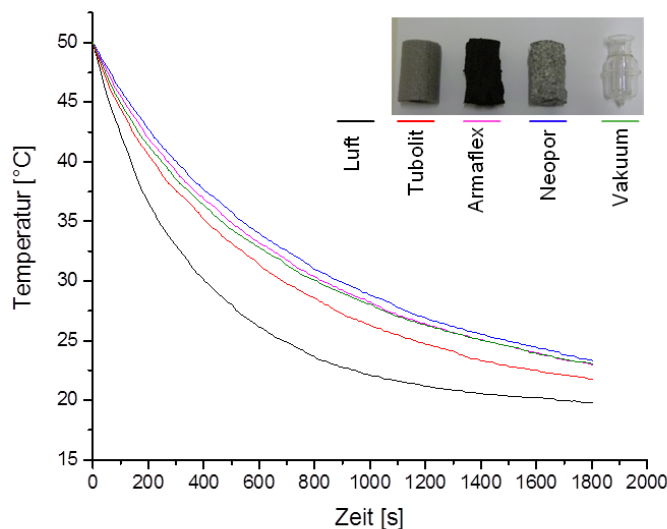


Abbildung 28: Evaluierung der Isolationsfähigkeit verschiedener Materialien anhand des Energieverlusts von temperiertem Wasser. Hierfür wurde jeweils 1 ml 50 °C-temperiertes Wasser in die entsprechende Isolierung eingebracht und der Temperaturabfall über die Zeit gemessen.

Für eine weitere Evaluierung wurde die Neopor®-basierte Probenkammer der Vakuumkammer gegenübergestellt. Im Rahmen dieser Testung wurden die Isolatoren in ein 50 °C bzw. 30 °C temperiertes Wasserbad eingebracht und ihre Isolationsfähigkeit hinsichtlich eines Energieeintrags von außen untersucht. Dies erfolgte vor dem Hintergrund eines während der induktiven Erwärmung störenden Wärmeeintrags von außen. Ein solcher Wärmeeintrag könnte durch das potentielle Aufheizen der Spule während des Erwärmungsprozesses resultieren. Die aus diesem Experiment hervorgehenden Temperaturprofile sind in Abbildung 29 gegenübergestellt. Daraus geht hervor, dass bei einer Umgebungstemperatur von 50 °C die Vakuumkammer die Temperatur wesentlich geringer ansteigen lässt als die Neopor®-basierte Probenkammer. Demnach wirkt die doppelwandige Vakuumkammer einem Wärmeeintrag in die Probe effizienter entgegen. Bei einer niedrigeren Umgebungstemperatur von 30 °C kann die hier konstruierte Vakuumkammer die Probentemperatur über einen sehr langen Zeitraum nahezu konstant halten. Dies wird durch den äußerst flachen Anstieg der Temperatur-Zeit-Kurve belegt. Basierend auf diesen Evaluierungsexperimenten wurde sich auf die selbst entwickelte Vakuumkammer als die Probenkammer der Wahl festgelegt. Sie gilt damit als fester Bestandteil des Set-ups zum induktiven Heizen. Die Konzeption dieser Kammer ermöglicht zudem die Probe mittig in der Spule zu positionieren. Dadurch ist sowohl der Erwärmprozess, als auch die Temperaturmessung unter reproduzierbaren Bedingungen möglich. Der

Energieaustausch zwischen Probe und Umgebung sollte durch Verwendung dieser Kammer beim induktiven Heizen minimiert werden. Dies lässt sich zumindest aus den hier gezeigten Ergebnissen schlussfolgern.

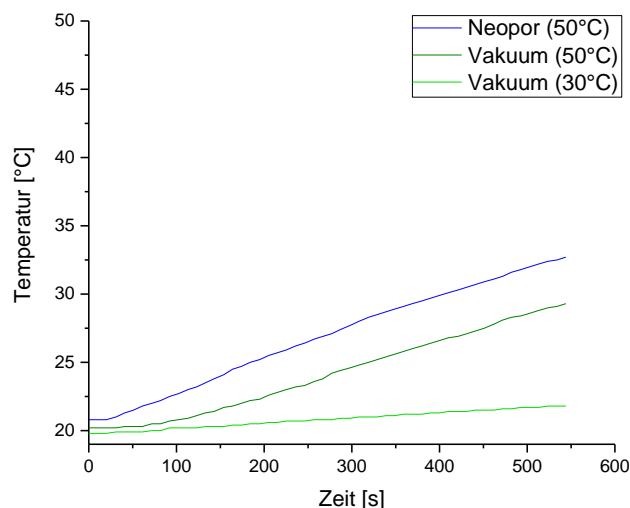


Abbildung 29: Evaluierung der Fähigkeit der aus Neopor® bestehenden Probenkammer sowie der Vakuum-Kammer einem Energieeintrag entgegenzuwirken. Zur Testung wurden die beiden Isolatoren in ein 50 °C bzw. 30 °C temperiertes Wasserbad eingebracht und der Temperaturverlauf der Probe (1 ml H₂O) über die Zeit gemessen.

3.2.2 Evaluierung von Heizverhalten beeinflussender Parametern

Ein wichtiger Aspekt, den es im Rahmen dieser Arbeit zunächst zu adressieren galt, war die Identifikation potentieller Parameter, die das Heizverhalten beim induktiven Erwärmungsprozess beeinflussen. Die systematische Herangehensweise und die Kenntnis dieser Einflussfaktoren stellen die Basis für eine effiziente induktive Erwärmung der Kompositpartikel und deren Applikation dar. Im Fokus der Evaluierung standen im Wesentlichen zwei Parameter, deren Einfluss anhand des Heizverhaltens reiner Magnetit-NP untersucht wurde. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Evaluierung vorgestellt und diskutiert.

3.2.2.1 Einfluss der Konzentration an Magnetit-NP

Der erste Parameter, dessen Einfluss auf das Heizverhalten der Magnetit-NP untersucht wurde, stellt die Konzentration der Magnetit-NP dar. Die induktive Erwärmung von superparamagnetischen Partikeln, wie den hier verwendeten Magnetit-NP, resultiert aufgrund der Brown- und Néel-Relaxation.^[145] Beim Anlegen eines magnetischen Wechselfeldes trägt demnach jeder einzelne, in der Partikelsuspension enthaltene NP zur Erwärmung dieser Suspension bei. Ausgehend von dieser Annahme, ist bei einer Erhöhung der Partikelkonzentration prinzipiell eine höhere Wärmegenerierung zu erwarten. Die messtechnisch erfassbare

Temperatur der Partikelsuspension wird von dieser Wärmegenerierung und dem Wärmeverlust an die Umgebung beeinflusst. Unterschiedliche Partikelkonzentrationen müssten demnach in unterschiedlichen Temperaturprofilen resultieren. Anhand derer sollte ein, für die angestrebte Erwärmung der Kompositpartikel, geeigneter Konzentrationsbereich ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Partikelkonzentrationen dem Wechselmagnetfeld ausgesetzt. Die resultierende Erwärmung der jeweiligen Partikelsuspension wurde via Glasfaseroptik messtechnisch erfasst. Induktiv erwärmt wurden jeweils 500 μl in Chloroform vorliegende Magnetit-NP mit einer Konzentration von 20 mg/ml, 2 mg/ml und 0,2 mg/ml. In Abbildung 30 ist das Ergebnis dieser Evaluierung unter Anwendung einer Heizleistung von 0,23 kW beispielhaft gezeigt. Die Untersuchung wurde darüber hinaus auch für die anderen in dieser Arbeit genutzten Heizleistungen, d. h. 1,01 kW und 2,3 kW, vorgenommen. Der zu beobachtende Trend ist für alle drei Heizleistungen gleich. Daher wird an dieser Stelle, stellvertretend für sämtliche hier getesteten Heizleistungen, die in Abhängigkeit der Partikelkonzentration resultierende Temperaturprofile unter einer Heizleistung von 0,23 kW diskutiert.

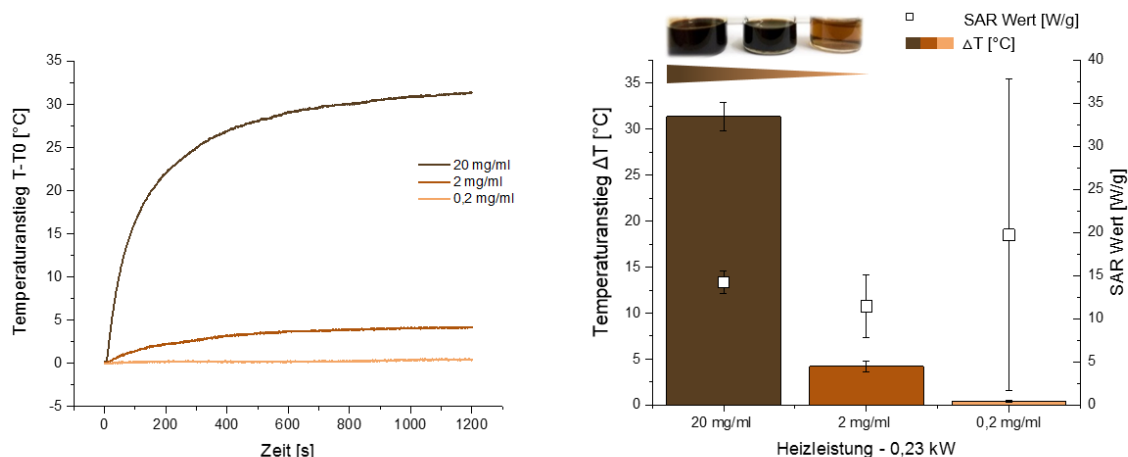


Abbildung 30: Einfluss der Partikelkonzentration auf die messtechnisch erfassbare Temperaturänderung der Partikelsuspension beim induktiven Heizen. Dargestellt ist der Temperaturverlauf über einen Messzeitraum von 1200 s der verschiedenen Partikelkonzentrationen (links) sowie den Temperaturanstieg ΔT der jeweiligen Partikelsuspension einschließlich der ermittelten SAR-Werte (rechts). Das zu erwärmende Volumen betrug jeweils 500 μl und die zur induktiven Erwärmung genutzte Heizleistung 0,23 kW ($n = 3$).

Das linke Diagramm in Abbildung 30 zeigt den aufgenommenen Temperaturverlauf der jeweiligen Partikelsuspensionen über den gesamten induktiven Erwärmungsprozess. Daraus lässt sich ableiten, dass die Temperatur, unabhängig von der jeweilig hier untersuchten Partikelkonzentration, zu Beginn der Erwärmung ansteigt und dann in ein Plateau übergeht. Die Abflachung der Heizkurve erklärt sich dadurch, dass der induktiv induzierten Wärmegenerierung durch die Magnetit-NP der Energieverlust an die Umgebung gegenübersteht. Aus der

Testung hinsichtlich Isolierfähigkeit ist bekannt, dass mit der Probenkammer keine adiabatischen Bedingungen realisierbar sind (siehe 3.2.1). Die Wärmegenerierung wird durch die Anzahl an Wärmegeneratoren, sprich Magnetit-NP, beeinflusst. Demnach korreliert die Höhe dieses Plateaus mit der Partikelkonzentration. Dies ist an den hier erhaltenen Temperaturprofilen deutlich zu erkennen. Bei der niedrig konzentrierten Suspension ist der Temperaturverlauf erwartungsgemäß durch eine wesentlich flacher ansteigende Kurve charakterisiert. Dieser Zusammenhang wird auch deutlich, wenn man den Temperaturanstieg über den gesamten Messzeitraum von 1200 s gegen die Partikelkonzentration aufträgt (siehe Abbildung 30; rechter Graph). Bei der geringsten Partikelkonzentration von 0,2 mg/ml beläuft sich Temperaturänderung auf $\Delta T = 0,4 \pm 0,1$ °C, wohingegen bei der höchsten Magnetit-NP Konzentration eine Änderung von $\Delta T = 31,4 \pm 1,5$ °C zu beobachten ist. Ein derartiges konzentrationsabhängiges Verhalten ist in der Literatur auch für die induktive Erwärmung von Magnetit-NP unter anderen Heizbedingungen beschrieben.^[146] Darauf basierend lässt sich an dieser Stelle folgendes festhalten: Um die induktive Erwärmung der Partikelsuspension messtechnisch erfassen zu können, muss die Konzentration an Magnetit-NP ausreichend hoch sein. Beispielsweise sollte die Konzentration an Magnetit-NP bei der hier genutzten Heizleistung von 0,24 kW nicht kleiner als 0,2 mg/ml sein. Andernfalls ist die Erwärmung der Partikelsuspension messtechnisch nicht nachweisbar. Die induktive Erwärmung der Magnetit-NP ist aufgrund des parallel stattfindenden Wärmeverlusts nicht ausreichend, um die Temperatur der Partikelsuspension signifikant zu erhöhen. Die Partikelkonzentration ist somit ein wichtiger Aspekt, den es im Hinblick auf die angedachte induktive Erwärmung der Kompositartikel zu berücksichtigen gilt.

Die generelle Fähigkeit unter induktiven Heizbedingungen Wärme zu generieren ist theoretisch unabhängig von der Konzentration der Magnetit-Partikel. Dies ist in der Literatur für diverse magnetische Nanopartikel beschrieben.^[147, 148] Dies lässt sich auch für die in dieser Arbeit genutzten Magnetit-NP anhand von SAR-Wert Berechnungen belegen. Die Unabhängigkeit des SAR-Wertes von der Partikelkonzentration geht bereits aus der zur Berechnung zugrundeliegenden Formel hervor. Darin berücksichtigt ist nämlich die Masse an Magnetit-NP. Die von den magnetischen Partikeln generierte Wärme wird durch die Masse der magnetischen Partikel normalisiert. Der SAR-Wert ermöglicht somit den Vergleich anderer, auf die Heizeffizienz einflussnehmender Parameter, wie beispielsweise die Frequenz oder die Partikelbeschaffenheit. Eine akkurate Bestimmung des SAR-Wertes setzt eigentlich ideale adiabatische Bedingungen voraus.^[149] Dies zu realisieren ist jedoch äußerst komplex. Daher ist die Nutzung der initialen Steigung der Temperatur-Zeit-Kurve nach Einschalten des Wechselmagnetfeldes gängige Praxis, um diesen charakteristischen Wert zu erhalten.^[146, 150, 151] Die initiale Steigung wurde auch in dieser Arbeit zur Ermittlung des SAR-Wertes herangezogen (hier Heizrate nach $t = 60$ s). Die Berechnung des SAR-Wertes erfolgte gemäß der nachstehenden Formel:

$$SAR (W/g) = \frac{m_{Probe} \times c_{CHCl_3}}{m_{NP}} \times \left(\frac{dT}{dt} \right)_{initial}$$

- mit:
- m_{Probe} : Masse der Probe berechnet aus $V_{Probe} \times \rho_{Chloroform}$ (g)
 - m_{NP} : Masse an Magnetit-NP (g)
 - c_{CHCl_3} : spezifische Wärmekapazität von Chloroform ($J/g \cdot K^{-1}$)
 - $(\Delta T / \Delta t)_{initial}$: Heizrate nach $t = 60$ s

In der vorliegenden Arbeit wurden für die getesteten Konzentrationen die SAR-Werte unter einer Heizleistung von 0,24 kW nach obiger Formel ermittelt. Die Ergebnisse dieser SAR-Wert Bestimmung sind in Abbildung 30 dargestellt. Betrachtet man die SAR-Werte, so ist zu erkennen, dass sich diese für die hier getesteten Konzentrationen bei einer Heizleistung von 0,23 kW nicht wirklich unterscheiden. Dieses Ergebnis ist erwartungsgemäß und, wie erwähnt, auch für diverse andere magnetische Nanopartikel beschrieben.

3.2.2.2 Einfluss der Heizleistung

Der zweite Parameter, dessen Einfluss auf das Heizverhalten beim induktiven Erwärmungsprozess untersucht wurde, ist die verwendete Heizleistung. Evaluiert wurden in diesem Zusammenhang die drei HF-Ausgangsleistungen 0,23 kW, 1,01 kW und 2,3 kW. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die aus der vorangegangenen Evaluierung der Partikelkonzentration bekannten Konzentrationen von 0,2 mg/ml, 2 mg/ml und 20 mg/ml genutzt. Es zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Heizleistung auf die Wärmegenerierung. Dies geht aus der vergleichenden Darstellung der initialen Temperaturänderung nach 60 s (ΔT_{60s}) unter den hier getesteten Heizleistungen deutlich hervor (siehe Abbildung 31). Die Temperaturänderung zu diesem Zeitpunkt ($t = 60$ s) nimmt mit größer werdender Heizleistung zu. Dieser Trend spiegelt sich darüber hinaus bei jeder der hier evaluierten Konzentration wieder. Betrachtet man z. B. die Temperaturänderung der Partikelsuspension mit einer Magnetit-NP Konzentration von 2 mg/ml in Abhängigkeit der Heizleistung, so steigt diese Änderung von $\Delta T \sim 0,6$ °C bei 0,23 kW auf $\Delta T \sim 7$ °C bei 2,3 kW an. Anzumerken ist, dass bei den Heizleistungen 1,01 kW und 2,3 kW und den höheren Konzentrationen 2 mg/ml und 20 mg/ml die Wärmegenerierung so groß war, dass eine Aufnahme des Temperaturverlaufs über den kompletten Messzeitraum nicht möglich war. Dies liegt darin begründet, dass im Laufe der induktiven Erwärmung der Siedepunkt des Partikelsuspensionsmediums ($Sdp._{Chloroform} \hat{=} 61$ °C) erreicht wurde. Daher musste die Erwärmung entsprechend abgebrochen werden, um eine Aufkonzentrierung und damit verbunden eine Ergebnisverfälschung zu vermeiden. Um die Einflussuntersuchung der Heizleistung dennoch zu ermöglichen, wurde die Temperaturänderung nach den initialen 60 s herangezogen. Die zu diesem Zeitpunkt erreichte Temperatur lag bei allen Konzentrationen

und unter allen Heizleistungen unterhalb des Siedepunktes von Chloroform. Damit ist die Voraussetzung einer generellen Vergleichbarkeit der Heizrate zu diesem Zeitpunkt gegeben.

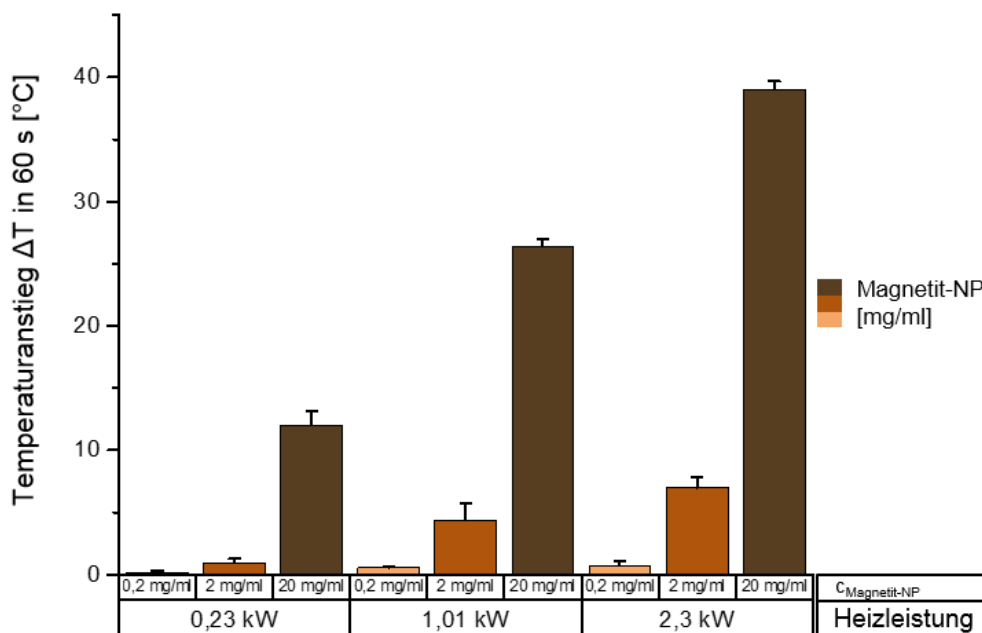


Abbildung 31: Darstellung des Temperaturanstiegs ΔT nach 60 s in Abhängigkeit der Heizleistung und der jeweiligen Partikelkonzentration. Das Volumen der jeweiligen induktiv zu erwärmenden Partikelsuspension belief sich auf 500 μl ($n = 3$).

Die initialen Heizraten (dT/dt) wurden herangezogen, um den Einfluss der Heizleistung auf den SAR-Wert und somit die Heizeffizienz der Partikel zu untersuchen. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Heizleistung und SAR-Wert wurde exemplarisch anhand der Partikelsuspension mit einer Magnetit-NP Konzentration von 2 mg/ml vorgenommen. Die Berechnung des SAR-Wertes erfolgte unter Verwendung der im vorherigen Kapitel eingeführten Formel (siehe 3.2.2.1). Das entsprechende Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt. Daraus geht eine deutliche Abhängigkeit des SAR-Wertes von der zur induktiven Erwärmung genutzten Heizleistung hervor. Mit Erhöhung der Heizleistung nimmt der SAR-Wert und somit die Wärmegenerierung pro Masse Magnetit-NP kontinuierlich zu. Mit einem bei der Heizleistung von 0,23 kW beginnenden Wert von $11,4 \pm 3,6 \text{ W/g}$ steigt der SAR-Wert bei 1,1 kW auf $51,7 \pm 16,6 \text{ W/g}$ an und weist bei der höchsten Heizleistung einen Wert von $82,9 \pm 10,1 \text{ W/g}$ auf. Die durch das induktive Heizen erbrachte Wärmeleistung pro Gramm Magnetit-NP lässt sich demnach durch die Heizleistung bedeutend beeinflussen. Die Variation der HF-Ausgangsleistung hat einen Einfluss auf die Feldparameter. Dass derartige Feldparameter die Wärmegenerierung von magnetischen Partikeln beeinflussen ist über die von Rosensweig etablierte Gleichung bereits ausgedrückt.^[94]

Zudem beschreiben mehrere Veröffentlichungen einen derartigen Zusammenhang für verschiedenste magnetische Partikeltypen.^[146, 147] Im Rahmen einer Arbeit von Shah et al.^[147] beispielsweise, konnte die Signifikanz der Magnetfeldparameter anhand der induktiven Erwärmung von Dextran-gecoateten Eisenoxid-NP eindrucksvoll gezeigt werden. Über die Erhöhung der Magnetfeldstärke konnte die Heizrate der Partikel und somit auch der SAR-Wert wesentlich gesteigert werden. Der gleiche Trend konnte durch Erhöhung der Frequenz gezeigt werden. Dabei wurden beide Parameter und ihr Einfluss einzeln voneinander getestet.^[147] Mit zunehmender Frequenz rotieren die Spins der Eindomänen-Partikel schneller, wodurch letztlich die Wärmegenerierung verstärkt wird. Dies stellt ein möglicher Erklärungsansatz für die hier beobachtete Relation zwischen Heizleistung und Wärmegeneration dar. Darüber hinaus ist der Einfluss von Parametern wie Magnetfeldstärke und Frequenz auf die Wärmeleistung der magnetischen Partikel hinreichend bekannt und in der Literatur beschrieben.^[151]

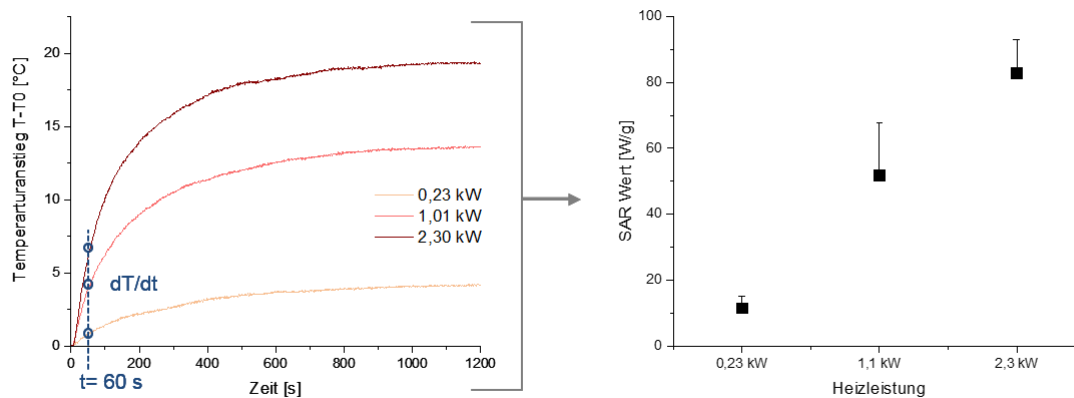


Abbildung 32: Einfluss der Heizleistung auf den Temperaturverlauf beim induktiven Erwärmen einer Partikelsuspension mit einer Konzentration an Magnetit-NP von 2 mg/ml (links). Ausgehend von diesen Temperatur-Zeit-Kurven wurde $(\Delta T/\Delta t)_{60s}$ ermittelt und die entsprechenden SAR-Werte berechnet (rechts). Das zu erwärmende Volumen betrug jeweils 500 µl (n = 3).

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass die im Rahmen der Evaluierung erhaltenen Ergebnisse eine wichtige Grundlage für die induktive Erwärmung der Kompositpartikel darstellen. Die gewählte Heizleistung ist entscheidend für eine effiziente Erwärmung der in dieser Arbeit verwendeten Magnetit-NP. Um diese Erwärmung messtechnisch erfassen zu können ist eine ausreichend hohe Magnetit-NP Konzentration anzustreben.

3.2.3 Heizverhalten von Magnetit-PLGA-Nanopartikel

Die induktive Erwärmbarekeit der Magnetit-PLGA-NP wurde auf Basis der Erkenntnisse untersucht, welche die vorherige Evaluierung der reinen Magnetit-NP hervorbrachte. Dabei wurde angenommen, dass die identifizierten Parameter, die das Heizverhalten reiner Magnetit-NP beeinflussen, sich auf die Magnetit-PLGA-NP und deren Heizverhalten übertragen

lassen. Diese Annahme erfolgte unter dem Aspekt, dass diese Magnetit-NP den notwendigen Bestandteil der Kompositpartikel für die induktive Erwärmung darstellen. Um eine mögliche Erwärmung überhaupt messtechnisch erfassen zu können, wurden die Magnetit-PLGA-NP entsprechend aufkonzentriert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Menge an inkorporierten Magnetit-NP, bezogen auf das zu erwärmende Probenvolumen, größer als 0,2 mg/ml ist. Die wässrige Partikelsuspension wurde mit einer Heizleistung von 0,23 kW und 2,3 kW induktiv erwärmt. In Abbildung 33 ist das Ergebnis dieser induktiven Erwärmung gezeigt. Die dargestellten Temperaturverläufe indizieren deutlich die induktive Erwärmbarkeit der Magnetit-PLGA-NP. Auch ist zu erkennen, dass die Wärmegenerierung der magnetischen Kompositpartikel, wie schon bei den reinen Magnetit-NP beobachtet, stark von der Heizleistung abhängt. Bei der geringeren Heizleistung von 0,23 kW wird im Rahmen des induktiven Erwärmprozesses ein Temperaturanstieg von $\Delta T = 2,1 \pm 1,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erzielt, wohingegen im gleichen Zeitraum bei der höheren Heizleistung ein fast zehnfach höherer Anstieg von $\Delta T = 20,1 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erreicht wird. Die hier gezeigte heizleistungsabhängige Wärmegenerierung wurde, wie bereits erwähnt, schon bei den reinen Magnetit-NP beobachtet. Entsprechende Erklärungsansätze hierfür sind anhand der reinen Magnetit-NP bereits in Kapitel 3.2.2.2 ausführlich diskutiert und werden an dieser Stelle nicht wiederholt.

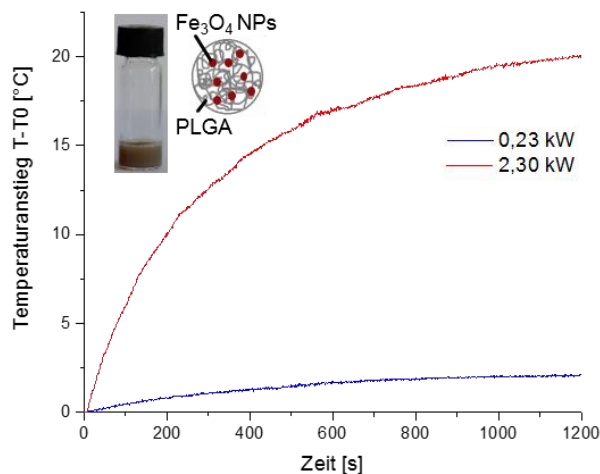


Abbildung 33: Einfluss der beim induktiven Erwärmen von Magnetit-PLGA-NP genutzten Heizleistung auf den resultierenden Temperaturverlauf der Partikelsuspension. Das Volumen der jeweiligen induktiv zu erwärmenden Partikelsuspension belief sich auf 500 μl ($n = 3$).

Für das mit den Magnetit-PLGA-NP angestrebte Vorhaben, die Mukusbarriere durch eine induzierte Erwärmung der Partikel und einer dadurch postulierten lokalen Viskositätserniedrigung zu überwinden, sind die hier erzielten Ergebnisse essentiell. Die nachgewiesene Heizbarkeit der magnetischen Kompositpartikel stellt in diesem Kontext die Grundvoraussetzung dar. Die Fragestellung, inwieweit sich die Partikelkonzentration reduzieren lässt, um unter

den hier genutzten Heizbedingungen noch eine Erwärmung detektieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht adressiert. Hauptaugenmerk lag auf dem Nachweis der prinzipiellen Erwärmbarkeit dieser Partikel. Dass sich dies nur an einer hochkonzentrierten Partikelsuspension untersuchen lässt ist der Tatsache geschuldet, dass nur der Temperaturanstieg der Suspension messtechnisch zugänglich ist. Die induktiv erwärmten Partikel liefern als Output keine bestimmte Temperatur, sondern Wärme. Diese Wärme wird an das Suspensionsmedium abgegeben und die resultierende Temperatur ist von der Wärmekapazität des Mediums sowie den thermischen Umgebungsbedingungen abhängig. Das ist zugleich die Erklärung für das Abflachen der Heizkurven über die Zeit. Je größer der Gradient zwischen Probe und Umgebung ist, desto größer ist der Wärmeverlust. Bei einer gering konzentrierten Probe oder bei einer geringen Heizleistung wird vergleichsweise weniger Wärme an das Suspensionsmedium abgegeben. Folglich ist die resultierende Temperaturänderung bei gleichbleibender Wärmekapazität des Suspensionsmediums geringer.

Für den hier verfolgten Ansatz wäre die Temperaturänderung an der Partikeloberfläche wesentlich interessanter als die des Suspensionsmediums. Dieses Interesse liegt in der Annahme begründet, dass die Temperatur direkt an der Partikeloberfläche wesentlich höher sein müsste als die gemessene Suspensionstemperatur. Eine experimentelle Verifizierung dieser Annahme erfolgte beispielsweise indem man ein Fluorophor über ein thermosensitives Molekül an PEGylierte Eisenoxidpartikel koppelte. Dadurch ließ sich nachweisen, dass beim induktiven Heizen die Temperatur in Oberflächennähe der Partikel ($\sim 0,5$ nm) wesentlich höher ist als die messbare Suspensionstemperatur.^[152] Eine derartige Temperaturmessung ist jedoch äußerst komplex und routinemäßig derzeit nicht einfach realisierbar. In diesem Zusammenhang gibt es mehrere Forschungsansätze, die sich mit dieser Problematik und Fragestellung befassen.^[153, 154] Für die angedachte Applikation stellt die Oberflächentemperatur der Partikel ein wichtiger zukünftig zu adressierender Aspekt dar. Letztlich ist die induktive Erwärmung der Kompositpartikel so anzupassen, dass die Mukusbarriere überwunden werden kann ohne dabei das unterliegende Epithel aufgrund zu hoher Temperatur und einer daraus induzierten Zelloptose zu schädigen.

3.2.4 Heizverhalten von Magnetit-RhoBPLGA-Nanopartikel

Die gezeigte induktive Erwärmbarkeit der Magnetit-PLGA-NP stellte die Basis für die weitere Vorgehensweise hinsichtlich des hier verfolgten Ansatzes zur Überwindung der Mukusbarriere dar. Im Hinblick darauf wurde ein Set-up etabliert, welches zu Detektionszwecken fluoreszenzmarkierte Magnetit-PLGA-NP vorsieht (siehe Kapitel 2.3.3.1). Infolgedessen wurden auch die Rhodamin B markierten Magnetit-PLGA-NP hinsichtlich ihres Heizverhaltens im elektromagnetischen Feld untersucht. Die Untersuchung beschränkte sich allerdings auf die Verwendung der höchsten Heizleistung von 2,3 kW. Die notwendige Aufkonzentrierung erfolgte analog zu den ungelabelten Kompositpartikeln. Das Ergebnis dieser induktiven Erwärmung ist in Abbildung 34 gezeigt. Die ansteigende Temperaturkurve impliziert die Fähigkeit

dieser fluoreszenzmarkierten Nanokomposite sich unter den gewählten Heizbedingungen induktiv zu erwärmen. Nach einer Heizzeit von 1200 s konnte ein Temperaturanstieg von $\Delta T = 19,23 \pm 1,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erzielt werden. Damit ergibt sich für die Magnetit-beladenen RhoBPLGA-NP unter gleicher Aufkonzentrierung und Heizbedingung ein mit den ungelabelten Magnetit-PLGA-NP vergleichbares Heizprofil (vgl. $\Delta T_{1200 \text{ s Magnetit-PLGA-NP}} = 20,1 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Da die Beladung mit Magnetit sowie die magnetischen Charakteristika für beide Kompositpartikel vergleichbar sind war dieses Ergebnis zu erwarten. Demnach können die Magnetit-RhoBPLGA-NP als Äquivalent angesehen werden. Ihre Verwendung anstelle der Magnetit-PLGA-NP ist somit für das weitere Vorgehen legitimiert. Die hieraus resultierenden Ergebnisse sollten sich theoretisch mit den Magnetit-PLGA-NP reproduzieren lassen.

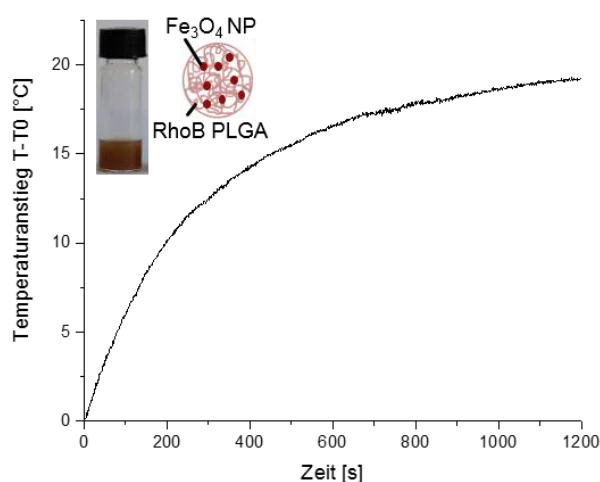


Abbildung 34: Temperaturanstieg von Magnetit-PLGA-NP unter induktiven Heizbedingungen. Das Volumen der jeweiligen induktiv erwärmten Partikelsuspension belief sich auf 500 μl . Die applizierte Heizleistung betrug 2,23 kW ($n = 3$).

3.3 Induktives Heizen zur Verbesserung der Mukuspenetration

3.3.1 Einfluss einer Gesamterwärmung auf die Partikelpenetration im Modellgel

Der in der Arbeit verfolgte neuartige Ansatz zur Überwindung der Mukusbarriere setzt an einer wärmeinduzierten Penetrationsverbesserung dieser Barriere an. Die intendierte Erwärmung soll lokal und induktiv über das die Barriere zu überwindend beabsichtigte Wirkstoff-trägersystem erfolgen. Die grundlegende Hypothese, sprich, dass die Mukusbarriere unter Wärmeeinfluss besser zu penetrieren ist, galt es zunächst in einer grundsätzlichen Machbarkeitsstudie nachzuweisen. Hierfür wurde im Rahmen der Arbeit ein spezielles Set-up

entwickelt, welches die Untersuchung der prognostizierten temperaturabhängigen Partikelpenetration in Mukus unter induktiven Heizbedingungen ermöglichen sollte.

Zunächst wurde dieses Set-up jedoch genutzt um den grundsätzlichen Einfluss von Wärme auf das Migrationsverhalten näher zu untersuchen und zwar im Mukus-Modellgel, sprich 1%igem HEC-Gel. Hierfür wurden Schlauchstücke mit diesem Gel befüllt, bevor anschließend Magnetit-RhoBPLGA-NP aufgegeben wurden. Das Modellgel simuliert dabei die von den Partikeln zu überwindende Mukusbarriere. Die Fähigkeit der Partikel diese Barriere zu penetrieren wurde vergleichend unter Raumtemperatur und 40 °C untersucht. Die Schlauchstücke mit den aufgegebenen fluoreszierenden magnetischen Kompositpartikeln wurden hierzu für 30 min den beiden genannten Temperaturen ausgesetzt. Zur Erhaltung des Penetrationsmusters wurden sie anschließend eingefroren, in Sektionen aufgeschnitten und diese hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität mittels CLSM untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 35 graphisch dargestellt.

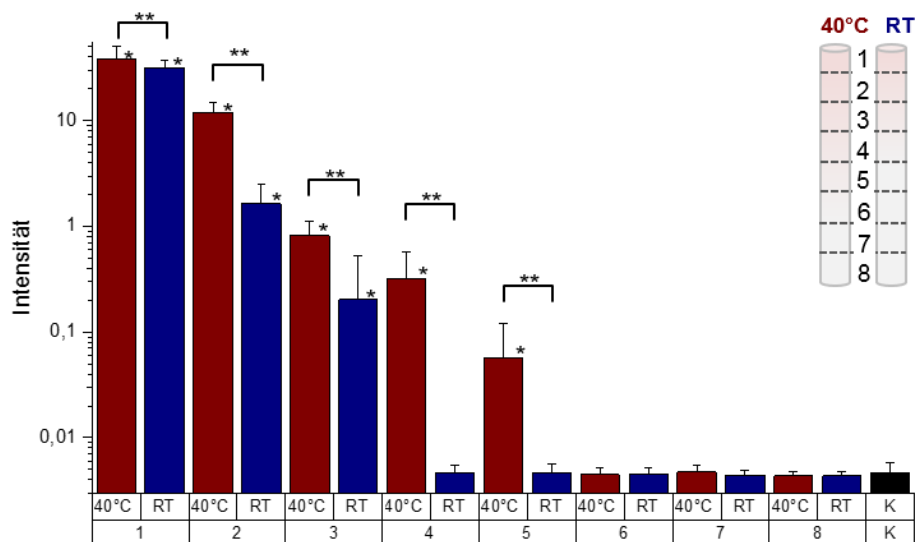


Abbildung 35: Vergleichende Darstellung des Penetrationsmusters Rhodamin B markierter Magnetit-PLGA-NP im Modellgel HEC nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und 40 °C. * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (K), d. h. HEC ohne Partikel ($p < 0,05$). ** signifikanter Unterschied in der jeweiligen Sektion unter RT und 40 °C ($p < 0,05$). Die Intensität jeder Sektion wurde für jeden Versuch anhand von 15 Bildern gemessen, d. h. die gezeigte Intensität wurde bei drei Experimenten anhand von 45 Bildern bestimmt ($n = 3$).

Anzumerken ist, dass die Sektion 1 den aufgegebenen Partikeln entspricht, die eigentliche von den Partikeln zu penetrierende Barriere beginnt erst ab Sektion 2. Verfolgt man die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Sektionen ist zu erkennen, dass diese Intensität über die Länge des Schlauchstücks hin abnimmt. Dieser Trend ist sowohl für die Partikelpenetration unter Raumtemperatur als auch unter 40 °C zu beobachten. Die zurückgelegte Penetrationsstrecke ist hingegen bei der höheren Temperatur wesentlich größer. Unter

Erwärmung penetrieren die Partikel bis in Sektion 5, wohingegen Partikel unter Raumtemperaturbedingungen nur bis in Sektion 3 detektiert werden konnten. Darüber hinaus ist die Fluoreszenzintensität in den jeweiligen Sektionen bei Erwärmung signifikant höher als unter Raumtemperatur. Die Intensität ist proportional zu der Konzentration angeregter Fluoreszenzmoleküle, welche hier Bestandteil der Nanokomposite sind. Folglich bedeutet ein signifikanter Intensitätsunterschied einen signifikanten Unterschied der Partikelanzahl in der entsprechenden Sektion.

Das aus dieser ersten Machbarkeitsstudie erhaltene Ergebnis lässt den Rückschluss zu, dass sich das Partikelpenetrationsmuster im Mukus-Modellgel über die Temperatur beeinflussen lässt. Eine Temperaturerhöhung wirkt sich demnach positiv auf die Partikelmobilität im Modellgel HEC aus. Hintergrund hierfür ist sehr wahrscheinlich die Erniedrigung der Viskosität des HEC-Gels durch die höhere Temperatur. Dass die Viskosität des Hydrogels HEC mit der Temperatur korreliert ist bekannt. Für ein 1,5%igen HEC-Gel, beispielsweise, erniedrigt sich die dynamische Viskosität von 3,200 mPas bei 25 °C auf 1,900 mPas bei 37 °C. Zudem ist durch sogenannte Einzelpartikelverfolgung in unterschiedlichen Hydrogelen ein Zusammenhang zwischen dynamischer Viskosität und Partikelmigration indiziert.^[155]

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zum einen das entwickelte Set-up zur Detektion des Partikelpenetrationsmusters in HEC geeignet ist, zum anderen eine Temperaturerhöhung die Penetration der Kompositpartikel im Modellgel HEC verbessert. Inwieweit sich darüber die Penetrierbarkeit der Mukusbarriere verbessern lässt galt es im nächsten Schritt zu untersuchen.

3.3.2 Einfluss einer Gesamterwärmung auf die Partikelpenetration im Mukus

Das Ergebnis aus der vorherigen ersten Machbarkeitsstudie zum Einfluss von Wärme auf das Partikelpenetrationsverhalten im Mukus-Modellgel galt es auf nativen Mukus zu übertragen. Hierfür wurde ebenfalls auf das in dieser Arbeit entwickelte und etablierte Set-up zurückgegriffen. Die Untersuchungsbedingungen wurden gleich gehalten bis auf die Ausnahme, dass die Schlauchstücke mit Pferdemukus anstelle des zuvor verwendeten HEC als Modellgel befüllt wurden. Das Ergebnis dieser Penetrationsexperimente ist in Abbildung 36 gezeigt.

Anzumerken ist, dass wie im vorherigen Experiment mit HEC, die von den Partikeln zu penetrierende Barriere, erst ab Sektion 2 beginnt. Sektion 1 entspricht dem Auftrageort der Partikel. Betrachtet man den Verlauf der Fluoreszenzintensität, so ist auch hier zu beobachten, dass diese Intensität unter beiden Inkubationstemperaturen zu den Schlauchenden hin abnimmt. Vergleicht man die Penetrationstiefen unter den beiden Inkubationsbedingungen ist jedoch ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Eine Erhöhung der Temperatur resultiert in einer Erhöhung der zurückgelegten Penetrationsstrecke. Die Partikel penetrieren unter Erwärmung weiter. Bei 40 °C bis in Sektion 5, wohingegen die Penetration unter Raumtemperatur nur bis Sektion 3 detektierbar ist.

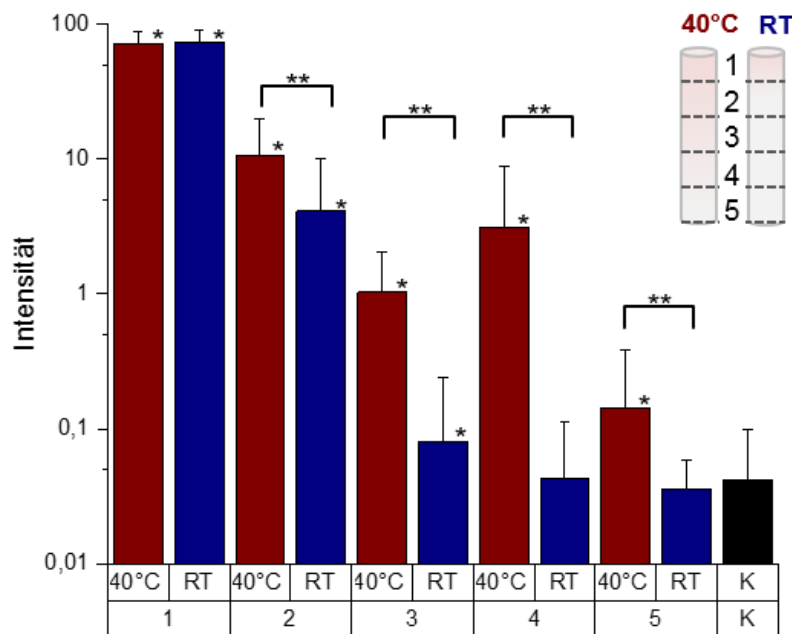


Abbildung 36: Vergleichende Darstellung des Penetrationsmusters Rhodamin B markierter Magnetit-PLGA-NP in Mukus nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und 40 °C. * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (K), d. h. Pferdemucus ohne Partikel ($p < 0,05$). ** signifikanter Unterschied in der jeweiligen Sektion unter RT und 40 °C ($p < 0,05$). Die Intensität jeder Sektion wurde für jeden Versuch anhand von 20 Bildern gemessen, d. h. die gezeigte Intensität wurde bei vier Experimenten anhand von 80 Bildern bestimmt ($n = 4$).

Damit konnte die zuvor gemachte Kernbeobachtung in nativem Mukus wiederholt und zugleich die Ausgangshypothese für den angestrebten Ansatz verifiziert werden. Die Penetrierbarkeit der Mukusbarriere lässt sich unter Wärmeeinfluss verbessern. Wie schon zuvor bei dem Modellgel diskutiert, liegt die Vermutung nahe, dass diese bessere Penetrierbarkeit auf eine durch die Erwärmung induzierte Viskositätserniedrigung zurückzuführen ist. Der Zusammenhang zwischen Viskosität und Partikelmobilität stellt nicht nur das Leitmotiv des in dieser Arbeit verfolgten Ansatzes die Mukusbarriere zu überwinden dar. Es gibt auch die Strategie die Viskosität von Mukus durch den Einsatz mukolytischer Enzyme zu erniedrigen.^[72, 73] Für Papain modifizierte Nanopartikel konnte verglichen mit unmodifizierten Kontrollpartikeln eine signifikant bessere Penetrierbarkeit dieser Barriere gezeigt werden. Da eine Inkubation von Mukus mit dem entsprechenden Enzym in einer Viskositätserniedrigung resultierte, ist davon auszugehen, dass sich die verbesserte Penetration der modifizierten NP auf deren viskositätserniedrigende Eigenschaft zurückführen lässt.^[72]

Für die in dieser Arbeit zu beobachtende bessere Penetrierbarkeit von Mukus infolge einer Erwärmung scheint demnach eine wärmeinduzierte Viskositätserniedrigung als Ursache sehr plausibel. Eine Untersuchung hinsichtlich der Temperaturabhängigkeit der Viskosität von Mukus könnte womöglich diese Annahme stützen. Derartige rheologische Untersuchungen konnten bisher noch nicht erhoben werden. Information, wie Diffusionsdaten bzw. Scherdaten

des Gels, die aus mikro- und makrorheologische Untersuchungen erhalten werden haben für die angedachte Applikation eine geringe Relevanz. Für eine erste Hypothesentestung, inwieweit die Mukusbarriere unter Wärmeeinfluss besser zu penetrieren ist, erschien das hier etablierte Penetrationsexperiment die geradlinigste Vorgehensweise.

Gleichzeitig indiziert das Penetrationsexperiment, dass sich das Modellgel HEC und der Mukus in ihren Barriereeigenschaften unterscheiden. Der zu beobachtende Trend im Hinblick auf die Temperaturabhängigkeit der Partikelpenetration ist in beiden Geltypen gleich. Das HEC-Gel scheint jedoch für die aufgegebenen Partikel eine weniger starke Barriere darzustellen als nativer Mukus. Dies lässt sich anhand der von den Partikeln zurückgelegten unterschiedlichen Penetrationsstrecke in beiden Geltypen schlussfolgern (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 36). Die Wahl des HEC-Gels, als gängiges Modellgel, in diesem Kontext stützt sich auf seine chemische Ähnlichkeit zu den Muzinen, den Hauptkomponenten von Mukus sowie dem zu Mukus ähnlichem mikrorheologischen Verhalten.^[41, 42] Im Hinblick auf die zu beobachtende Diskrepanz der Penetration in HEC und Mukus gilt es den folgenden Erklärungsansatz zu berücksichtigen: Mukus besteht nicht nur aus Muzinen sondern aus vielen weiteren Bestandteilen. Jede einzelne Komponente könnte die Partikelmobilität entsprechend beeinflussen. Daher ist die zu beobachtende Diskrepanz nicht völlig unerwartet. Resümierend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass sich das HEC-Gel trotz dieser Diskrepanzen grundsätzlich als Modellgel für Mukus eignet. Die Partikelmobilität in Mukus scheint jedoch insgesamt stärker und vermutlich von mehreren Faktoren beeinflusst zu werden. An dieser Stelle ist vor allem auf die Heterogenität dieses Gels zu verweisen, insbesondere in Bezug auf die Maschenweite. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte für Mukus im Vergleich zu HEC eine sehr viel heterogenere Struktur nachgewiesen werden.^[42] Dies betrifft nicht nur die Porengröße und Verteilung, sondern bezieht sich auch auf die Beschaffenheit des Polymergerüsts.^[42, 156]

Aufgrund der sehr heterogenen Maschenweite wird hinsichtlich der Penetrierbarkeit des Mukus auch eine Filterung nach Partikelgröße diskutiert.^[42, 81] Diese Heterogenität stellt auch einen Erklärungsansatz für den unerwarteten Anstieg des Intensitätswerts bei Sektion 4 dar. In einem der mit Mukus befüllten Schlauchstücke könnten im Bereich der Sektion 4 sehr kleine Poren vorliegen wodurch die Partikel aufgrund ihrer Größe z. T. immobilisiert wurden. Die Partikelanzahl korreliert mit der Fluoreszenzintensität, wodurch sich die vergleichsweise hohen Intensitätswerte erklären lassen.

Resümierend lässt sich festhalten, dass eine Gesamterwärmung die Penetrierbarkeit der Mukusbarriere signifikant verbessert. Damit konnte der erste grundlegende Machbarkeitsnachweis für die angedachte neuartige Überwindungsstrategie der Mukusbarriere erbracht werden. Inwieweit sich die bessere Penetrierbarkeit auf die hier postulierte wärmeinduzierte Viskositätserniedrigung des Mukus zurückführen lässt, kann anhand der hier erzielten Ergebnisse nur

spekuliert werden. Die indizierte temperaturabhängige Viskosität von Mukus gilt es anhand rheologischer Messungen weiter zu untersuchen.

Das hier etablierte Set-up und die damit erzielten Ergebnisse stellten in der vorliegenden Arbeit die Basis für das weitere experimentelle Vorgehen dar. Der nächste logische Schritt in diesem Kontext, stellte die Wiederholung der Penetrationsexperimente unter induktiven Heizbedingungen dar.

3.3.3 Einfluss der Wärmeinduktion auf die Partikelmigration in HEC/ Mukus

Die Gültigkeit der gefundenen Relation zwischen Gesamterwärmung und Partikelpenetration in HEC bzw. Mukus galt es im nächsten Schritt für die induktive Erwärmung zu überprüfen. Zur Einflussuntersuchung der durch diese Art von Erwärmung postulierten induzierten lokalen Erwärmung wurde das Penetrationsexperiment-Setup entsprechend adaptiert. Anstatt die HEC bzw. Mukus befüllten Schlauchstücke bei 40 °C im Ganzen zu erwärmen, wurden sie in den Induktor eingebracht und einer Heizleistung von 2,3 kW für 20 min ausgesetzt. Zunächst wurde dies in einem Vorversuch anhand des 1%igen Mukusmodellgels HEC untersucht. Entgegen der Erwartung war das resultierende Partikelpenetrationsmuster unter beiden Bedingungen gleich. Die induktiv erwärmten Kompositpartikel zeigten, wie auch die nicht erwärmten Partikel, eine detektierbare Penetration bis in Sektion 3. Der Versuch wurde anschließend unter Verwendung von nativem Pferdemukus wiederholt. Das Ergebnis hierzu ist in Abbildung 37 graphisch dargestellt. Daraus geht hervor, dass auch in Pferdemukus kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Penetration der Partikel unter induktiven Heizbedingungen (IH) und der Inkubation bei Raumtemperatur (RT) zu beobachten ist. Das erhaltene Penetrationsmuster weicht dabei deutlich von dem charakteristisch stufenförmigen Muster ab, welches bei den Penetrationsexperimenten erhalten wurde, in denen der Einfluss einer Gesamterwärmung untersucht wurde.

Das hier erhaltene Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die erzielte induktiv generierte Wärme nicht ausreichend hoch war, um einen signifikanten Unterschied gegenüber dem Penetrationsmuster der bei Raumtemperatur inkubierten Partikeln zu erhalten. Die Kompositpartikel wurden, wie zuvor, in Form einer wässrigen Partikelsuspension auf die Mukusschicht aufgegeben. Erwärmen sich die Partikel induktiv ist davon auszugehen, dass diese Wärme an das umgebende Suspensionsmedium abgegeben wird. Dies gilt auch für die Partikel, die das unterliegende Mukus-Gel infiltrieren. Bei dem Suspensionsmedium handelt es sich um Wasser, welches zugleich auch Hauptbestandteil von Mukus ist. Wasser hat mit 4,18 kJ/kgK eine vergleichsweise große spezifische Wärmekapazität. Dies bedeutet, es ist vergleichsweise viel Energie aufzuwenden, um eine entsprechende Temperaturdifferenz herbeizuführen. Penetrieren die Partikel in den unterliegenden Mukus wird die generierte Wärme an das Hydrogel abgeführt. Diese Wärme ist vermutlich jedoch nicht ausreichend, um das umliegende Gel deutlich zu erwärmen. Dadurch wird die postulierte lokale Viskositätserniedrigung

möglicherweise nicht induziert. Zumindest konnte mit dem in dieser Arbeit etablierten Set-up zur Untersuchung der Partikelmigration keine Penetrationsverbesserung infolge der induktiven Erwärmung messtechnisch erfasst werden. Dies impliziert jedoch nicht zwangsläufig, dass eine derartige Verbesserung der Partikelpenetration unter induktiven Heizbedingungen nicht grundsätzlich möglich ist.

Es ist beispielsweise denkbar, dass die Sektionierung des Schlauchstücks mit einem Abstand von 0,5 cm zu groß gewählt ist. Aufgrund zu groß gewählter Sektionen wäre ein prinzipiell vorhandener, aber kleiner Unterschied im Penetrationsmuster gegenüber den nicht erwärmten Partikeln unmöglich nachzuweisen. Ein Erklärungsansatz der in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht detaillierter untersucht wurde. Lediglich die prinzipielle Machbarkeit kleinerer Schnitte wurde in diesem Zusammenhang gezeigt. Demnach könnte eine Verkleinerung der Sektionen zur Untersuchung dieser Annahme mittels Kryotom oder virtuell am CLSM, durch sogenannte Ebenenschnitte (z-stacks), vorgenommen werden. Ein weiterer Aspekt, den es bezugnehmend auf das erhaltene Ergebnis zu berücksichtigen gilt, ist das Verhältnis der Kompositpartikel und somit letztlich der Wärmegeneratoren an sich. Möglicherweise war die zu Penetrationszwecken aufgegebene Menge an Wärmegeneratoren zu gering, um über deren Erwärmung die Viskosität des umliegenden Mukus lokal zu erniedrigen. Es ist auch denkbar, dass zur Herbeiführung der postulierten lokalen Viskositätserniedrigung eine kritische Menge solcher Wärmegeneratoren pro Volumen zwingend vorhanden sein muss. Anders gesagt, eine kollektive Erwärmung erforderlich ist. Zur Steigerung der Heizeffizienz ist entweder die aufgegebene Menge an Kompositpartikeln, die Menge der darin verkapselten Magnetit-NP oder die Heizleistung zu erhöhen. Den prinzipiellen Konzentrationseinfluss der Wärmegeneratoren auf die messtechnisch erfassbare Wärmegenerierung konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden (vgl. Kapitel 3.2.2.1). Bezugnehmend darauf wurde ein Penetrationsexperiment mit einer wesentlich höheren Konzentration an Kompositpartikeln angestrebt. Diese Untersuchung erfolgte unter Verwendung von 1%igem HEC-Gel. Der verfolgte Ansatz scheiterte jedoch, da die Partikel in dieser Konzentration direkt nach deren Aufgabe, womöglich aufgrund von Agglomeration, sedimentierten. Das HEC-Gel stellte demnach keine Barriere mehr dar. Eine Erhöhung der HEC-Konzentration (5% und 10%) wirkte dieser Sedimentation zwar entgegen, eine via induktive Erwärmung induzierte Penetrationsverbesserung war auch hier nicht zu beobachten. Zudem ist an dieser Stelle anzumerken, dass durch Erhöhung der HEC-Konzentration das resultierende Gel kein gutes Mukus-Modellgel mehr ist. Ferner ist davon auszugehen, dass durch die Konzentrationserhöhung die Maschenweite des Gels reduziert wird. Ein derartiger Zusammenhang ist für eine Erhöhung der HEC-Konzentration von 0,5% auf 1% beschrieben.^[42] Dadurch wurden die Kompositpartikel womöglich auch aufgrund ihrer Größe an einer Penetration gehindert.

Neben einer Erhöhung der Anzahl an Wärmegeneratoren in den Kompositpartikeln, stellt die Erhöhung der Heizleistung eine weitere Option dar, die Heizeffizienz zu steigern. Der prinzipielle Zusammenhang zwischen Heizleistung und Heizeffizienz der Kompositpartikel konnte

im Rahmen dieser Arbeit bereits dargelegt werden (siehe 3.2.3). Die Penetrationsexperimente wurden mit der höchsten, in dieser Arbeit evaluierten Heizleistung von 2,3 kW durchgeführt. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass unter einer anderen Frequenz oder Magnetfeldstärke eine effizientere induktive Erwärmung der Kompositpartikel nicht auszuschließen ist. Dies gilt es in weiterführenden Arbeiten entsprechend zu untersuchen.

Resümierend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit unter Nutzung des zuvor etablierten Setups keine Einflussnahme der induktiven Erwärmung auf das Penetrationsmuster in HEC oder Mukus gezeigt werden konnte. Die zuvor unter Gesamterwärmung erhaltenen Ergebnisse ließen sich demnach unter induktiver Erwärmung nicht reproduzieren. Als mögliche Ursache hierfür wurden verschiedene Faktoren angeführt, deren Einfluss es diesbezüglich genauer zu untersuchen gilt. Hierunter fällt z. B. die Austestung anderer Heizparameter, die Variation der aufgegeben Menge an Wärmegeneratoren oder die Sektionierung des Schlauchstücks. Die Testung dieser Faktoren gilt es abzuwarten bevor eine Einflussnahme der Partikelpenetration unter induktiven Heizbedingungen grundsätzlich ausgeschlossen wird. Die zuvor in der Gesamterwärmung gezeigten Ergebnisse lassen aber auf eine prinzipielle Machbarkeit schließen.

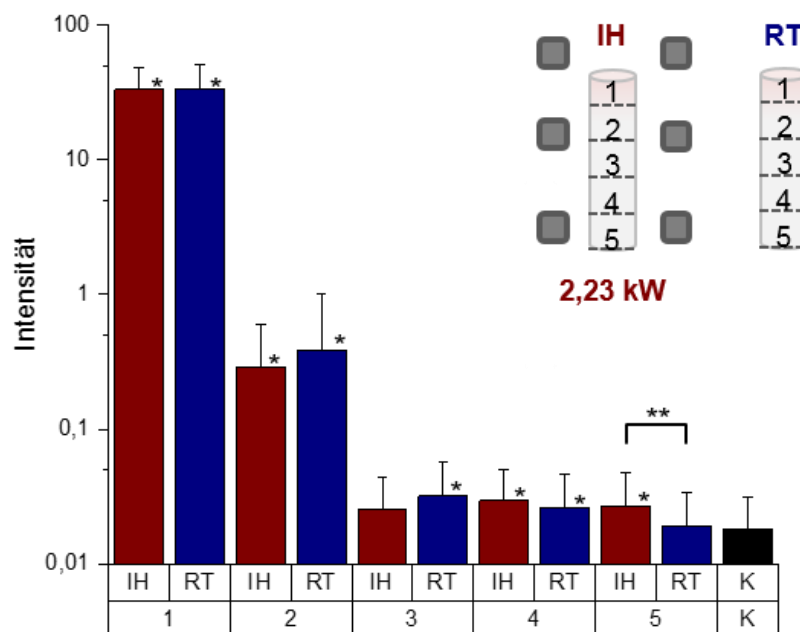


Abbildung 37: Vergleichende Darstellung der Penetrationsmuster Rhodamin B markierter Magnetit-PLGA-NP in Mukus nach 20-minütiger induktiver Erwärmung (IH) bei 2,23 kW sowie unter Inkubation bei Raumtemperatur (RT). * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (K), d. h. Pferdemukus ohne Partikel ($p < 0,05$). ** signifikanter Unterschied in der jeweiligen Sektion unter RT und induktiven Heizbedingungen ($p < 0,05$). Die Intensität jeder Sektion wurde für jeden Versuch anhand von 20 Bildern gemessen, d. h. die gezeigte Intensität wurde bei drei Experimenten anhand von 60 Bildern bestimmt ($n = 3$).

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem neuartigen pharmazeutisch-technologischen Ansatz zur Überwindung der Mukusbarriere. Diese nicht-zelluläre Barriere stellt eine äußerst wichtige und wirksame Schutzbarriere dar. Einerseits werden durch sie viele, mit der Atemluft eindringende Krankheitserreger abgefangen, andererseits steht sie aufgrund dieser Barriereeigenschaften einer effizienten pulmonalen Wirkstoffapplikation entgegen. Um die Effizienz der pulmonalen Applikation von Arzneistoffen zukünftig zu verbessern ist eine effektive Umgehung dieser Barriere notwendig. Dieses Zielvorhaben war auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die zugrundliegende Idee bestand darin ein Wirkstoffträgersystem zu entwickeln, welches über einen externen Stimulus in der Lage ist sich zu erwärmen. Darüber soll letztlich die Viskosität des umgebenden Mukus lokal erniedrigt und die Barriere für das Trägersystem penetrierbar werden. Bei dem Stimulus handelt es sich um ein extern angelegtes Wechsellmagnetfeld. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte sollte ein nanoskaliges, stimulus-responsives Trägersystem auf Basis der beiden biokompatiblen und biodegradierbaren Materialien PLGA und Magnetit entwickelt werden. Magnetit stellt bei diesen Kompositpartikeln die auf den Stimulus reagierende Komponente dar.

Es wurde sich zur Herstellung des intendierten Trägersystems in der vorliegenden Arbeit auf die Nanopräzipitation als Herstellungsmethode festgelegt. Im Zuge der Methodenentwicklung und Optimierung konnte ein Protokoll etabliert werden, mit Hilfe dessen sich derartige magnetische Nanokomposite reproduzierbar herstellen lassen. Die erhaltenen Partikel besitzen eine einheitliche, sphärische Partikelform und liegen eng verteilt mit einer Größe von ca. 200 nm vor. Die Magnetit-NP zeigen keine Agglomeration und sind in der PLGA-Matrix einzeln und homogen inkorporiert. Die Magnetit-Beladung lässt sich über den im Rahmen der Methodenevaluierung identifizierten Einflussfaktor, die eingesetzte Menge am Magnetit-NP, gezielt variieren und damit an spezifische Anforderungen anpassen. Die in der vorliegenden Arbeit als Standard festgelegte Einsatzmenge von 1 mg Magnetit-NP resultiert in den Kompositpartikeln in einer Magnetit-Beladung von ca. 2%. Diese Nanokomposite zeigen superparamagnetisches Verhalten, wobei die Sättigungsmagnetisierung erwartungsgemäß geringer ist als die der unverkapselten Magnetit-NP. Demnach ist bei den hergestellten Nanokompositen nach Magnetfeldexposition keine Restmagnetisierung zu beobachten. Ein wichtiges Kriterium für den potentiellen *in vivo* Einsatz dieser Partikel, da durch das Ausbleiben der Remanenz keine magnetisch induzierte Agglomeration zu erwarten ist. Bei Anlegung eines hochfrequenten Wechsellmagnetfeldes zeigen die zuvor aufkonzentrierten Magnetit-beladenen PLGA-NP eine deutliche Wärmegenerierung. Demnach wurde das erste Teilziel der vorliegenden Arbeit, die Entwicklung eines stimulus-responsiven Trägersystems auf Basis von PLGA und Magnetit, erreicht. Das etablierte Protokoll lässt sich darüber hinaus auch zur

Herstellung fluoreszierender Nanokomposite anwenden. Die Verwendung von Rhodamin B markiertem PLGA resultiert in einem Trägersystem mit vergleichbaren Charakteristika hinsichtlich Größe, Morphologie, Magnetisierung und induktiver Erwärmbarkeit. Im Hinblick auf die induktive Erwärmung des entwickelten Trägersystems ist eine vertiefende Evaluierung der Heizparameter anzustreben. Möglicherweise erwärmen sich die Nanokomposite bei einer anderen Feldstärke oder Frequenz wesentlich stärker. Ein weiterer zu untersuchender Aspekt ist das Toxizitätsprofil der Kompositpartikel. Auch wenn beide Trägersystemkomponenten als bioabbaubar und biokompatibel gelten, sind die Kompositpartikel im Hinblick auf eine medizinisch-therapeutische Anwendung hinsichtlich *in vitro* und *in vivo* Toxizität zu untersuchen. Aufgrund der vorgesehenen pulmonalen Applikation ist eine *in vitro*-Toxizitätstestung an in der Lunge vorkommenden Zelltypen sicherlich der erste zu vollziehende Schritt.

Die Adaption des Protokolls zur Herstellung magnetischer, mit dem Wirkstoff Ciprofloxacin co-beladener Kompositpartikel bedarf weiterer Optimierungsmaßnahmen. Ziel dieser Kobeladung war ein stimulus-responsives Trägersystem, welches in der Therapie *Pseudomonas aeruginosa* verursachter chronischer Lungeninfektionen eingesetzt werden kann. Die Magnetit-NP stellen auch hier die auf den Stimulus reagierende Systemkomponente dar. Bei Anlegen eines Wechsellängsfeldes erwärmen sich diese und es kommt, so die Idee, zur responsiven Freisetzung von Ciprofloxacin. Eine an das Herstellungsprotokoll der Kompositpartikel angelehnte Vorgehensweise, die u. a. ein Lösemittelwechsel von Aceton zu DMSO vorsieht, ermöglicht die Inkorporation von Magnetit-NP und Ciprofloxacin in die PLGA-Matrix. Eine gleichmäßige und homogene Kobeladung konnte nicht mehr erreicht werden. Ciprofloxacin wird wesentlich effizienter inkorporiert als die Magnetit-NP. Zurückführen lässt sich dies vermutlich auf eine gegenseitige Wechselwirkung beider Cargos. Möglicherweise tauscht sich das Ciprofloxacin mit der an der Oberfläche der Magnetit-NP gebundenen Ölsäure im Rahmen des Herstellungsprozesses der Komposite aus. Dadurch sind die Magnetit-NP vergleichsweise hydrophiler funktionalisiert und werden entsprechend schlechter in die hydrophobe Polymermatrix verkapselt. Gleichzeitig wird sich durch diesen Austauschprozess auch die Anzahl der zur Einkapselung zur Verfügung stehenden Wirkstoffmoleküle reduzieren. Dies würde zumindest die sinkende Beladung und Einkapselungseffizienz von Ciprofloxacin bei Erhöhung der zur Herstellung eingesetzten Menge an Magnetit-NP erklären. Inwieweit dieser Erklärungsansatz zutrifft ist durch entsprechende Untersuchungen abzuklären. Im Falle, dass sich der angenommene Ligandenaustausch bewahrheitet, sollte bei einer zukünftig angestrebten Kobeladung besser auf Wirkstoffe zurückgegriffen werden, bei denen ein solcher Austausch aufgrund ihrer chemischen Struktur nicht möglich ist. Ferner bleibt abzuklären wie hoch die Beladung mit Magnetit-NP zu wählen ist, um eine, für die intendierte responsive Wirkstofffreisetzung, ausreichende Wärmegenerierung zu erzielen. In diesem Kontext ist nochmals auf die bereits angeführte vertiefende Evaluierung der Heizparameter zu verweisen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit stellt die Hypothese dar, dass eine Erwärmung der Mukusbarriere die Penetration der Wirkstoffträger verbessert. Diese Erwärmung soll mittels externem, magnetfeldbasiertem Stimulus erfolgen. Zur Einflussuntersuchung der Mukuspenetrierbarkeit induktiv heizbarer Kompositpartikel galt es zunächst ein geeignetes Experimentdesign und Set-up zu finden. Die Setup-Entwicklung erfolgte anhand des Mukus-Modellgels HEC. Im Rahmen einer ersten Hypothesentestung wurde ein Penetrationsexperiment aufgesetzt, das zunächst den generellen Einfluss von äußerlich applizierter Wärme auf das Penetrationsverhalten der Nanokomposite im HEC-Gel untersucht. Hierzu wurden fluoreszierende Kompositpartikel auf ein mit Gel gefülltes Schlauchstück aufgebracht und bei 40 °C bzw. Raumtemperatur inkubiert. Zur Erhaltung des Penetrationsmusters wurden die Schlauchstücke eingefroren, in Sektionen aufgeschnitten und anschließend hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität mittels CLSM untersucht. Unter Verwendung des etablierten Versuchsaufbaus zeigt sich, dass die Kompositpartikel bei höherer Temperatur eine weitere Penetrationsstrecke zurücklegen als bei niedriger Temperatur. Die applizierte Wärme hat demnach einen signifikanten Einfluss auf die Penetration der Kompositpartikel im HEC-Gel. Dieser Zusammenhang ist auch unter Verwendung von nativem Mukus zu beobachten. Demnach scheint sich eine Erwärmung positiv auf die Partikelpenetration auszuwirken. Es liegt nahe, dass dies auf die postulierte Viskositätserniedrigung zurückzuführen ist. Diese Schlussfolgerung gilt es jedoch experimentell zu beweisen. Rheologische Untersuchungen könnten möglicherweise darüber Aufschluss geben, inwieweit sich die Viskosität von Mukus in Abhängigkeit der Temperatur ändert. Im Falle einer Korrelation würde dies, die dem verfolgten Ansatz zugrundeliegende Hypothese stützen. Daher sind derartige rheologische Daten unbedingt zu erheben. Zumal der unter extern applizierter Wärme gefundene Zusammenhang bei der induktiven Erwärmung nicht gezeigt werden kann. Eine induktive Erwärmung der Kompositpartikel führt mit dem derzeitigen Set-up nicht zu einer Penetrationsverbesserung. Zumindest lässt sich eine mögliche Penetrationsverbesserung mit dem aktuellen Versuchsaufbau weder in HEC noch in Mukus detektieren. Es ist davon auszugehen, dass die Temperatur des im Schlauch befindlichen HEC bzw. Mukus bei der induktiven Erwärmung der Partikel wesentlich geringer ist, als bei der äußerlich applizierten Gesamterwärmung. Der verfolgte Ansatz zur Überwindung der Mukusbarriere zielt auf eine lokale Erwärmung und keine Gesamterwärmung ab. Es ist jedoch nicht bekannt, um wie viel Grad sich ein Kompositpartikel erwärmen muss, um den ihn umgebenden Mukus lokal zu erwärmen. Die von den inkorporierten Magnetit-NP generierte Wärme wird an die Umgebung abgegeben, die im Fall von Mukus größtenteils aus Wasser besteht. Demnach ist vergleichsweise viel Energie aufzuwenden, um eine entsprechende Temperaturdifferenz und damit korrelierend die postulierte Viskositätsänderung herbeizuführen. Möglicherweise ist die Wärmegenerierung der aufgegebenen Partikel zu gering. Eine Steigerung dieser Wärmegenerierung ließe sich beispielsweise über eine höhere Anzahl an Wärmegeneratoren pro Volumen, d. h. Kompositpartikel bzw. darin inkorporiert vorliegenden Magnetit-NP, erzielen. Die Verwendung einer anderen Frequenz oder

Magnetfeldstärke wäre diesbezüglich eine weitere Option und macht zugleich deutlich, dass eine ausgedehnte Testung der Heizparameter ein interessanter anzugehender Aspekt ist. Zudem besteht grundsätzlich die Möglichkeit, die für den Stimulus verantwortliche Komponente gegen eine auf den Stimulus stärker reagierende Komponente auszutauschen. Dabei sollten jedoch die von den Magnetit-NP bestens erfüllten Prämissen Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit bewahrt werden.

Neben einer unzureichenden Wärmegenerierung stellt die Nicht-Detektierbarkeit der potentiell induktiv induzierten Penetrationsverbesserung ein weiterer Erklärungsansatz dar. Die Sektionierung des Schlauchstücks könnte für die induktiv erwärmten Kompositpartikel zu groß gewählt sein. Sie wurde aus den vorangegangenen Penetrationsexperimenten unter Gesamterwärmung übernommen. Unter der Annahme, dass die induktive Erwärmung der Kompositpartikel in einer lokalen Viskositätserniedrigung resultiert, ist die zurückgelegte Penetrationsstrecke möglicherweise kürzer, als bei Partikeln die in einem ohnehin erwärmten und somit viskositätserniedrigten Gel penetrieren. Damit wäre bei einer zu groß gewählten Sektion kein Intensitätsunterschied zur nicht geheizten Kontrolle nachweisbar. Kleinere Schnitte könnten durch die Verwendung eines Kryotoms realisiert werden. Damit kommen mehrere Faktoren in Betracht, die es näher zu untersuchen gilt, bevor eine Einflussnahme der Partikelpenetration unter induktiven Heizbedingungen grundsätzlich auszuschließen ist. Sofern durch die lokale Temperaturerhöhung keine Partikelimmobilisation induziert wird, sollte sich der Effekt, der sich bei der Gesamterwärmung des Mukus hinsichtlich des Penetrationsverhaltens abzeichnet, theoretisch auch unter induktiven Heizbedingungen erzielen lassen.

Zusammenfassend kann man festhalten: Es wurde im Rahmen der Arbeit ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Erwärmung von Mukus und dem Penetrationsverhalten der entwickelten Kompositpartikel gezeigt. Dies ist als ein erster prinzipieller Machbarkeitsnachweis für den hier angedachten, neuartigen Überwindungsansatz der Mukusbarriere zu werten. Das Ziel zukünftiger Arbeiten besteht darin, die durch Erwärmung induzierte und postulierte Viskositätserniedrigung experimentell zu beweisen. Darüber hinaus ist das Versuchsdesign des Penetrationsexperiments dahingehend zu optimieren, dass sich die bei der Gesamterwärmung gefundene Korrelation zwischen Partikelpenetration und Erwärmung auf die eigentlich intendierte induktive Erwärmung der Kompositpartikel übertragen lässt. Im Zuge dessen sind die angesprochenen potentiellen Einflussfaktoren näher zu untersuchen. Das entwickelte Trägersystem erfüllt prinzipiell die für den Überwindungsansatz gestellten Anforderungen. Es zeigt superparamagnetisches Verhalten und lässt sich induktiv erwärmen. Der erzielbare Wärmeeffekt ließe sich sicherlich über diverse Stellschrauben weiter optimieren. Gleiches gilt für eine Kobeladung mit Wirkstoff. Ein weiterer, sicherlich interessanter und anzugehender Aspekt ist die Fragestellung nach der Temperatur an der Partikeloberfläche beim induktiven Heizen. Sofern sich die Mukusbarriere über eine induktive Erwärmung des Trägersystems überwinden lässt, ist die Kenntnis der Oberflächentemperatur an den Partikeln ein entscheidender Faktor. Ist diese Temperatur zu hoch oder lässt sich im Rahmen der Penetration nicht rechtzeitig

reduzieren, ist von einer Schädigung des dem Mukus unterliegenden Epithels auszugehen. Daher ist dieser Fragestellung eine große Bedeutung beizumessen. In weiteren Entwicklungsschritten ist zudem das hier entwickelte nanoskalige Trägersystem für die pulmonale Applikation in eine mikropartikuläre Form zu überführen. Dies könnte beispielsweise über die Sprühtrocknung erreicht werden. Fazit: Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind richtungsweisend für weitere Optimierungsmaßnahmen, um letztlich die Entwicklung und Beforschung eines neuartigen und vielversprechenden Ansatzes zu Überwindung der Mukusbarriere voranzutreiben. Damit leistet die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag, um die Effizienz der pulmonalen Wirkstoffapplikation zukünftig weiter zu steigern.

Literaturverzeichnis

1. Labiris, N.R. and Dolovich, M.B., *Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2003. **56**(6): S. 588-599.
2. Cipolla, D.C. and Gonda, I., *Formulation technology to repurpose drugs for inhalation delivery*. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies, 2011. **8**(3-4): S. 123-130.
3. Garbuzenko, O.B., Mainelis, G., Taratula, O., and Minko, T., *Inhalation treatment of lung cancer: the influence of composition, size and shape of nanocarriers on their lung accumulation and retention*. Cancer Biology & Medicine, 2014. **11**(1): S. 44-55.
4. Levet, V., Rosiere, R., Merlos, R., Fusaro, L., Berger, G., Amighi, K., and Wauthoz, N., *Development of controlled-release cisplatin dry powders for inhalation against lung cancers*. Int J Pharm, 2016. **515**(1-2): S. 209-220.
5. Garbuzenko, O.B., Saad, M., Pozharov, V.P., Reuhl, K.R., Mainelis, G., and Minko, T., *Inhibition of lung tumor growth by complex pulmonary delivery of drugs with oligonucleotides as suppressors of cellular resistance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(23): S. 10737-10742.
6. Restrepo, M.I., Keyt, H., and Reyes, L.F., *Aerosolized Antibiotics*. Respir Care, 2015. **60**(6): S. 762-773.
7. Young, E.F., Hickey, A.J., and Braunstein, M., *Testing Inhaled Drug Therapies for Treating Tuberculosis*, in *Drug Delivery Systems for Tuberculosis Prevention and Treatment*, A.J. Hickey, P. Amit Misra, and B. Fourie, Editors. 2016, John Wiley & Sons: Hoboken. S. 111-130.
8. Cipolla, D., *Will pulmonary drug delivery for systemic application ever fulfill its rich promise?* Expert Opinion on Drug Delivery, 2016. **13**(10): S. 1337-1340.
9. Lipp, M.M., Batycky, R., Moore, J., Leinonen, M., and Freed, M.I., *Preclinical and clinical assessment of inhaled levodopa for OFF episodes in Parkinson's disease*. Sci Transl Med, 2016. **8**(360): S. 360ra136.
10. Avram, M.J., Spyker, D.A., Kehne, J.H., and Cassella, J.V., *The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zaleplon delivered as a thermally generated aerosol in a single breath to volunteers*. J Clin Pharmacol, 2013. **53**(2): S. 140-150.
11. Aurora, S.K., Silberstein, S.D., Kori, S.H., Tepper, S.J., Borland, S.W., Wang, M., and Dodick, D.W., *MAP0004, orally inhaled DHE: a randomized, controlled study in the acute treatment of migraine*. Headache, 2011. **51**(4): S. 507-517.
12. Cipolla, D. and Gonda, I., *Inhaled nicotine replacement therapy*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **10**(6): S. 472-480.
13. Tonnis, W.F., Kersten, G.F., Frijlink, H.W., Hinrichs, W.L., de Boer, A.H., and Amorij, J.P., *Pulmonary vaccine delivery: a realistic approach?* J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2012. **25**(5): S. 249-260.

14. Jia, Y., Krishnan, L., and Omri, A., *Nasal and pulmonary vaccine delivery using particulate carriers*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2015. **12**(6): S. 993-1008.
15. Mutschler, E., Schaible, H.G., Thews, G., and Vaupel, P., *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 2007, Stuttgart: Wiss. Verlag-Ges.
16. Weibel, E.R., *It Takes More than Cells to Make a Good Lung*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2013. **187**(4): S. 342-346.
17. Klein, S.G., Hennen, J., Serchi, T., Blomeke, B., and Gutleb, A.C., *Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung*. Toxicol In Vitro, 2011. **25**(8): S. 1516-1534.
18. Kirsch, J., May, C.A., Lorke, D., Winkelmann, A., and Schwab, W., *Taschenlehrbuch Anatomie*. 2010, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
19. Deller, T. and Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*, ed. U. Welsch and W. Kummer. 2010: Urban & Fischer Verlag/Elsevier.
20. Ruge, C.A., Kirch, J., and Lehr, C.-M., *Pulmonary drug delivery: from generating aerosols to overcoming biological barriers—therapeutic possibilities and technological challenges*. The Lancet Respiratory Medicine, 2013. **1**(5): S. 402-413.
21. Wanner, A., Salathe, M., and O'Riordan, T.G., *Mucociliary clearance in the airways*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(6 Pt 1): S. 1868-1902.
22. Rubin, B.K., *Physiology of airway mucus clearance*. Respir Care, 2002. **47**(7): S. 761-768.
23. Button, B., Cai, L.-H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D.B., Sheehan, J.K., Boucher, R.C., and Rubinstein, M., *A Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia*. Science, 2012. **337**(6097): S. 937-941.
24. Widdicombe, J.H. and Wine, J.J., *Airway Gland Structure and Function*. Physiological Reviews, 2015. **95**(4): S. 1241-1319.
25. Antunes, M.B. and Cohen, N.A., *Mucociliary clearance - a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment*. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2007. **7**(1): S. 5-10.
26. Clary-Meinesz, C., Mouroux, J., Cosson, J., Huitorel, P., and Blaive, B., *Influence of external pH on ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles*. European Respiratory Journal, 1998. **11**(2): S. 330-333.
27. Yager, J.A., Ellman, H., and Dulfano, M.J., *Human ciliary beat frequency at three levels of the tracheobronchial tree*. Am. Rev. Respir. Dis., 1980. **121**(4): S. 661-665.
28. Foster, W.M., Langenback, E., and Bergofsky, E.H., *Measurement of tracheal and bronchial mucus velocities in man: relation to lung clearance*. Journal of Applied Physiology, 1980. **48**(6): S. 965-971.
29. Cruz, R.S., Landa, J., Hirsch, J., and Sackner, M.A., *Tracheal Mucous Velocity in Normal Man and Patients with Obstructive Lung Disease; Effects of Terbutaline*. American Review of Respiratory Disease, 1974. **109**(4): S. 458-463.
30. Hofmann, W. and Asgharian, B., *The Effect of Lung Structure on Mucociliary Clearance and Particle Retention in Human and Rat Lungs*. Toxicological Sciences, 2003. **73**(2): S. 448-456.

31. Braiman, A. and Priel, Z., *Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008. **163**(1-3): S. 202-207.
32. Munkholm, M. and Mortensen, J., *Mucociliary clearance: pathophysiological aspects*. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2014. **34**(3): S. 171-177.
33. Fahy, J.V. and Dickey, B.F., *Airway Mucus Function and Dysfunction*. *New England Journal of Medicine*, 2010. **363**(23): S. 2233-2247.
34. Boucher, R.C., *Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration*. *Trends Mol Med*, 2007. **13**(6): S. 231-240.
35. Lai, S.K., Wang, Y.Y., Wirtz, D., and Hanes, J., *Micro- and macrorheology of mucus*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(2): S. 86-100.
36. Thornton, D.J., Rousseau, K., and McGuckin, M.A., *Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus*. *Annu Rev Physiol*, 2008. **70**: S. 459-486.
37. Lamblin, G., Lhermitte, M., Klein, A., Houdret, N., Scharfman, A., Ramphal, R., and Roussel, P., *The carbohydrate diversity of human respiratory mucins: a protection of the underlying mucosa?* *Am Rev Respir Dis*, 1991. **144**: S. 19-24.
38. Thornton, D.J. and Sheehan, J.K., *From Mucins to Mucus: Toward a More Coherent Understanding of This Essential Barrier*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2004. **1**(1): S. 54-61.
39. Schuster, B.S., Suk, J.S., Woodworth, G.F., and Hanes, J., *Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease*. *Biomaterials*, 2013. **34**(13): S. 3439-3446.
40. Radicioni, G., Cao, R., Carpenter, J., Ford, A.A., Wang, T.T., Li, Y., and Kesimer, M., *The innate immune properties of airway mucosal surfaces are regulated by dynamic interactions between mucins and interacting proteins: the mucin interactome*. *Mucosal Immunol*, 2016. **9**(6): S. 1442-1454.
41. Gross, A., Torge, A., Schaefer, U.F., Schneider, M., Lehr, C.M., and Wagner, C., *A foam model highlights the differences of the macro- and microrheology of respiratory horse mucus*. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2017. **71**: S. 216-222.
42. Kirch, J., Schneider, A., Abou, B., Hopf, A., Schaefer, U.F., Schneider, M., Schall, C., Wagner, C., and Lehr, C.M., *Optical tweezers reveal relationship between microstructure and nanoparticle penetration of pulmonary mucus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(45): S. 18355-18360.
43. Marianecchi, C., *Pulmonary Delivery: Innovative Approaches and Perspectives*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2011. **2**(5): S. 567-575.
44. Webb, J., Rees, J., and Clark, T.J., *A comparison of the effects of different methods of administration of beta-2-sympathomimetics in patients with asthma*. *British Journal of Diseases of the Chest*, 1982. **76**: S. 351-357.
45. Olsson, B., Bondesson, E., Borgström, L., Edsbäcker, S., Eirefelt, S., Ekelund, K., Gustavsson, L., and Hegelund-Myrbäck, T., *Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption*, in *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, H.D.C. Smyth and A.J. Hickey, Editors. 2011, Springer-Verlag New York: New York. S. 21-50.
46. Patton, J.S., C.S. F., and Weers, J.G., *The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2004. **1**(4): S. 338-334.

47. Cefalu, W.T., *Concept, Strategies, and Feasibility of Noninvasive Insulin Delivery*. Diabetes Care, 2003. **27**(1): S. 239-246.
48. Klonoff, D.C., *Afrezza Inhaled Insulin: The Fastest-Acting FDA-Approved Insulin on the Market Has Favorable Properties*. Journal of Diabetes Science and Technology, 2014. **8**(6): S. 1071-1073.
49. Yeh, H.C., Phalen, R.F., and Raabe, O.G., *Factors influencing the deposition of inhaled particles*. Environmental Health Perspectives, 1976. **15**: S. 147-156.
50. Langguth, P., Fricker, G., and Wunderli-Allenspach, H., *Biopharmazie*. 2012, Weinheim: Wiley-VHC.
51. Heyder, J., *Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(4): S. 315-320.
52. Bisgaard, H., O'Callaghan, C., and Smaldone, G.C., *Drug Delivery to the Lung*. 2001: CRC Press.
53. Labiris, N.R. and Dolovich, M.B., *Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2003. **56**(6): S. 600-612.
54. El-Sherbiny, I.M., El-Baz, N.M., and Yacoub, M.H., *Inhaled nano- and microparticles for drug delivery*. Global Cardiology Science & Practice, 2015. **2015**(2): S. 1-14.
55. Mansour, H.M., Rhee, Y.-S., and Wu, X., *Nanomedicine in pulmonary delivery*. International Journal of Nanomedicine, 2009. **4**: S. 299-319.
56. Huang, Y.-Y. and Wang, C.-H., *Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers*. Journal of Controlled Release, 2006. **113**(1): S. 9-14.
57. Cipolla, D., Gonda I Fau - Chan, H.-K., and Chan, H.K., *Liposomal formulations for inhalation*. Ther Deliv, 2013. **4**: S. 1047-1072.
58. Cipolla, D., Blanchard, J., and Gonda, I., *Development of Liposomal Ciprofloxacin to Treat Lung Infections*. Pharmaceutics, 2016. **8**(1): S. 6.
59. Elfinger, M., Maucksch, C., and Rudolph, C., *Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells*. Biomaterials, 2007. **28**(23): S. 3448-3455.
60. Shilpi, S., Vimal, V.D., and Soni, V., *Assessment of lactoferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for efficient targeting to the lung*. Progress in Biomaterials, 2015. **4**: S. 55-63.
61. Rytting, E., Nguyen, J., Wang, X., and Kissel, T., *Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv, 2008. **5**(6): S. 629-639.
62. D'Angelo, I., Conte, C., Miro, A., Quaglia, F., and Ungaro, F., *Pulmonary drug delivery: a role for polymeric nanoparticles?* Curr. Top. Med. Chem., 2015: S. 386-400.
63. Paranjpe, M. and Muller-Goymann, C.C., *Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): S. 5852-5873.

64. Amreddy, N., Babu, A., Muralidharan, R., Munshi, A., and Ramesh, R., *Polymeric Nanoparticle-Mediated Gene Delivery for Lung Cancer Treatment*. Top Curr Chem (J), 2017. **375**(2): S. 35.
65. Agent, P. and Parrott, H., *Inhaled therapy in cystic fibrosis: agents, devices and regimens*. Breathe, 2015. **11**(2): S. 110-118.
66. Rogers, D.F., *Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases*. Respiratory Care, 2007. **52**(9): S. 1176-1197.
67. Landini, G., Di Maggio, T., Sergio, F., Docquier, J.-D., Rossolini, G.M., and Pallecchi, L., *Effect of High N-Acetylcysteine Concentrations on Antibiotic Activity against a Large Collection of Respiratory Pathogens*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016. **60**(12): S. 7513-7517.
68. Stamm, S.J. and Docter, J., *Clinical evaluation of acetylcysteine as a mucolytic agent in cystic fibrosis*. Chest, 1965. **47**(4): S. 414-420.
69. App, E.M., Baran, D., Dab, I., Malfroot, A., Coffiner, M., Vanderbist, F., and King, M., *Dose-finding and 24-h monitoring for efficacy and safety of aerosolized Nacystelyn in cystic fibrosis*. Eur Respir J, 2002. **19**(2): S. 294-302.
70. Manniello, M.D., Del Gaudio, P., Aquino, R.P., and Russo, P., *Clarithromycin and N-acetylcysteine co-spray-dried powders for pulmonary drug delivery: A focus on drug solubility*. International Journal of Pharmaceutics, 2017: S. in press.
71. Rohrer, J., Partenhauser, A., Hauptstein, S., Gallati, C.M., Matuszczak, B., Abdulkarim, M., Gumbleton, M., and Bernkop-Schnürch, A., *Mucus permeating thiolated self-emulsifying drug delivery systems*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016. **98**: S. 90-97.
72. Müller, C., Leithner, K., Hauptstein, S., Hintzen, F., Salvenmoser, W., and Bernkop-Schnürch, A., *Preparation and characterization of mucus-penetrating papain/poly(acrylic acid) nanoparticles for oral drug delivery applications*. Journal of Nanoparticle Research, 2012. **15**(1): S. 1353.
73. Samaridou, E., Karidi, K., de Sousa, I.P., Cattoz, B., Griffiths, P., Kammona, O., Bernkop-Schnürch, A., and Kiparissides, C., *Enzyme-Functionalized PLGA Nanoparticles with Enhanced Mucus Permeation Rate*. Nano LIFE, 2014. **4**(4): S. 1441013.
74. Chen, E.Y., Daley, D., Wang, Y.-C., Garnica, M., Chen, C.-S., and Chin, W.-C., *Functionalized carboxyl nanoparticles enhance mucus dispersion and hydration*. Scientific Reports, 2012. **2**: S. 211.
75. Liu, M., Zhang, J., Shan, W., and Huang, Y., *Developments of mucus penetrating nanoparticles*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **10**(4): S. 275-282.
76. Tang, B.C., Dawson, M., Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Suk, J.S., Yang, M., Zeitlin, P., Boyle, M.P., Fu, J., and Hanes, J., *Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(46): S. 19268-19273.
77. Suk, J.S., Kim, A.J., Trehan, K., Schneider, C.S., Cebotaru, L., Woodward, O.M., Boylan, N.J., Boyle, M.P., Lai, S.K., Guggino, W.B., and Hanes, J., *Lung gene therapy with highly compacted DNA nanoparticles that overcome the mucus barrier*. Journal of Controlled Release, 2014. **178**: S. 8-17.

78. Wang, Y.Y., Lai, S.K., Suk, J.S., Pace, A., Cone, R., and Hanes, J., *Addressing the PEG Mucoadhesivity Paradox to Engineer Nanoparticles that "Slip" through the Human Mucus Barrier*. Angewandte Chemie-International Edition, 2008. **47**(50): S. 9726-9729.
79. Yang, M., Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Zhong, W., Happe, C., Zhang, M., Fu, J., and Hanes, J., *Biodegradable Nanoparticles Composed Entirely of Safe Materials that Rapidly Penetrate Human Mucus*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(11): S. 2597-2600.
80. Nafee, N., Husari, A., Maurer, C.K., Lu, C., de Rossi, C., Steinbach, A., Hartmann, R.W., Lehr, C.-M., and Schneider, M., *Antibiotic-free nanotherapeutics: Ultra-small, mucus-penetrating solid lipid nanoparticles enhance the pulmonary delivery and anti-virulence efficacy of novel quorum sensing inhibitors*. Journal of Controlled Release, 2014. **192**: S. 131-140.
81. Lieleg, O. and Ribbeck, K., *Biological hydrogels as selective diffusion barriers*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(9): S. 543-551.
82. Murgia, X., Pawelzyk, P., Schaefer, U.F., Wagner, C., Willenbacher, N., and Lehr, C.-M., *Size-Limited Penetration of Nanoparticles into Porcine Respiratory Mucus after Aerosol Deposition*. Biomacromolecules, 2016. **17**(4): S. 1536-1542.
83. Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Cone, R., Wirtz, D., and Hanes, J., *Altering Mucus Rheology to "Solidify" Human Mucus at the Nanoscale*. PLOS ONE, 2009. **4**(1): S. e4294.
84. Issa, B., Obaidat, I.M., Albiss, B.A., and Haik, Y., *Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(11): S. 21266-21305.
85. Sorensen, C.M., *Magnetism*, in *Nanoscale Materials in Chemistry*, K.J. Klabunde, Editor. 2002, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken. S. 169-221.
86. Laurent, S., Henoumont, C., Stanicki, D., Boutry, S., Lipani, E., Belaid, S., Muller, R.N., and Vander Elst, L., *MRI Contrast Agents: From Molecules to Particles*. 2016, Singapore: Springer Singapore.
87. Vollath, D., *Nanowerkstoffe für Einsteiger*. 2014, Weinheim: Wiley-VCH Verlag
88. Dave, S.R. and Gao, X., *Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2009. **1**(6): S. 583-609.
89. Wahajuddin and Arora, S., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers*. International Journal of Nanomedicine, 2012. **7**: S. 3445-3471.
90. Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., and Dobson, J., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2003. **36**(13): S. 167-181.
91. Deatsch, A.E. and Evans, B.A., *Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2014. **354**: S. 163-172.
92. Schmidt, A.M., *Thermoresponsive magnetic colloids*. Colloid and Polymer Science, 2007. **285**(9): S. 953-966.

93. Cruz, M.M., Ferreira, L.P., Alves, A.F., Mendo, S.G., Ferreira, P., Godinho, M., and Carvalho, M.D., *Nanoparticles for magnetic hyperthermia*, in *Nanostructures for Cancer Therapy*, A. Grumezescu and A. Fica, Editors. 2017, Elsevier. S. 485-511.
94. Rosensweig, R.E., *Heating magnetic fluid with alternating magnetic field*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2002. **252**: S. 370-374.
95. Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., and Sen, T., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(1-2): S. 24-46.
96. Cornell, R.M. and Schwertmann, U., *Crystal Structure*, in *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, R.M. Cornell and U. Schwertmann, Editors. 2003, Wiley-VCH Verlag S. 9-38.
97. Gossuin, Y., Gillis, P., Hocq, A., Vuong, Q.L., and Roch, A., *Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2009. **1**(3): S. 299-310.
98. Dunlop, D.J. and Özdemir, Ö., *Rock Magnetism: Fundamentals and Frontiers*. Cambridge Studies in Magnetism. 1997, Cambridge: Cambridge University Press.
99. Wang, Y.-X.J., Hussain, S.M., and Krestin, G.P., *Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging*. European Radiology, 2001. **11**(11): S. 2319-2331.
100. Weissleder, R., Stark, D.D., Engelstad, B.L., Bacon, B.R., Compton, C.C., White, D.L., Jacobs, P., and Lewis, J., *Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity*. American Journal of Roentgenology, 1989. **152**(1): S. 167-173.
101. Revia, R.A. and Zhang, M., *Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances*. Materials Today, 2016. **19**(3): S. 157-168.
102. Wang, Y.-X.J., *Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application*. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery, 2011. **1**(1): S. 35-40.
103. Neuwelt, A., Sidhu, N., Hu, C.-A.A., Mlady, G., Eberhardt, S.C., and Sillerud, L.O., *Iron-Based Superparamagnetic Nanoparticle Contrast Agents for MRI of Infection and Inflammation*. American Journal of Roentgenology, 2015. **204**(3): S. 302-313.
104. Bates, D., Abraham, S., Campbell, M., Zehbe, I., and Curiel, L., *Development and Characterization of an Antibody-Labeled Super-Paramagnetic Iron Oxide Contrast Agent Targeting Prostate Cancer Cells for Magnetic Resonance Imaging*. PLOS ONE, 2014. **9**(5): S. e97220.
105. Mu, K., Zhang, S., Ai, T., Jiang, J., Yao, Y., Jiang, L., Zhou, Q., Xiang, H., Zhu, Y., Yang, X., and Zhu, W., *Monoclonal Antibody-Conjugated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Cells and Gliomas*. Molecular Imaging, 2015. **14**(5): S. 1-12.
106. Alexiou, C., Tietze, R., Schreiber, E., Jurgons, R., Richter, H., Trahms, L., Rahn, H., Odenbach, S., and Lye, S., *Cancer therapy with drug loaded magnetic nanoparticles—magnetic drug targeting*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2011. **323**(10): S. 1404-1407.
107. Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R.J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., and Lübke, A.S., *Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting*. Cancer Research, 2000. **60**(23): S. 6641-6648.

108. Schleich, N., Po, C., Jacobs, D., Ucakar, B., Gallez, B., Danhier, F., and Préat, V., *Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of multifunctional paclitaxel/SPIO-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy*. Journal of Controlled Release, 2014. **194**: S. 82-91.
109. Mura, S., Nicolas, J., and Couvreur, P., *Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery*. Nat Mater, 2013. **12**(11): S. 991-1003.
110. Huang, H.-Y., Hu, S.-H., Chian, C.-S., Chen, S.-Y., Lai, H.-Y., and Chen, Y.-Y., *Self-assembling PVA-F127 thermosensitive nanocarriers with highly sensitive magnetically-triggered drug release for epilepsy therapy in vivo*. Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(17): S. 8566-8573.
111. Oliveira, H., Pérez-Andrés, E., Thevenot, J., Sandre, O., Berra, E., and Lecommandoux, S., *Magnetic field triggered drug release from polymersomes for cancer therapeutics*. Journal of Controlled Release, 2013. **169**(3): S. 165-170.
112. Shi, C., Thum, C., Zhang, Q., Tu, W., Pelaz, B., Parak, W.J., Zhang, Y., and Schneider, M., *Inhibition of the cancer-associated TASK 3 channels by magnetically induced thermal release of Tetrandrine from a polymeric drug carrier*. J Control Release, 2016. **237**: S. 50-60.
113. Zhao, L.-Y., Liu, J.-Y., Ouyang, W.-W., Li, D.-Y., Li, L., Li, L.-Y., and Tang, J.-T., *Magnetic-mediated hyperthermia for cancer treatment: Research progress and clinical trials*. Chinese Physics B, 2013. **22**(10): S. 108104.
114. Gobbo, O.L., Sjaastad, K., Radomski, M.W., Volkov, Y., and Prina-Mello, A., *Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics*. Theranostics, 2015. **5**(11): S. 1249-1263.
115. Sun, S., Zeng, H., Robinson, D.B., Raoux, S., Rice, P.M., Wang, S.X., and Li, G., *Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(1): S. 273-279.
116. Gunday Tureli, N., Tureli, A.E., and Schneider, M., *Counter-ion complexes for enhanced drug loading in nanocarriers: Proof-of-concept and beyond*. Int J Pharm, 2016. **511**(2): S. 994-1001.
117. Gunday Tureli, N., Tureli, A.E., and Schneider, M., *Optimization of ciprofloxacin complex loaded PLGA nanoparticles for pulmonary treatment of cystic fibrosis infections: Design of experiments approach*. Int J Pharm, 2016. **515**(1-2): S. 343-351.
118. Keck, C.M., *Laserdiffraktometrie*, in *Moderne Pharmazeutische Technologie*, C.M.K.a.R.H. Müller, Editor. 2009. S. 50-55.
119. Müller, R.H., Schuhmann, R., *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik Paperback, ed. R.H. Müller and R. Schuhmann. 1996, Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
120. Thomas, J. and Gemming, T., *Analytische Transmissionselektronenmikroskopie: Eine Einführung für den Praktiker*. 2013, Wien: Springer-Verlag Wien.
121. Hayat, M.A. and Miller, S.E., *Negative Staining*. 1990, New York: McGraw-Hill
122. Reimer, L. and Pfefferkorn, G., *Raster-Elektronenmikroskopie*. 2013, Berlin, Heidelberg: Springer
123. Nalwa, H.S., *Deposition and Processing*. 2001: Elsevier Science & Technology Books.

124. Skoog, D.A., Leary, J.J., and Crouch, S.R., *Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen*, ed. R. Niessner. 2013, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
125. Welz, B. and Sperling, M., *Atomabsorptionsspektrometrie*. 2012, Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
126. Welz, B., Becker-Ross, H., Florek, S., and Heitmann, U., *Special Features of HR-CS AAS*, in *High-Resolution Continuum Source AAS*. 2006, Wiley-VCH Verlag Weinheim. S. 57-75.
127. Meyer, V.R., *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 2008, Weinheim: Wiley-VHC.
128. Rietscher, R., Thum, C., Lehr, C.M., and Schneider, M., *Semi-automated nanoprecipitation-system--an option for operator independent, scalable and size adjustable nanoparticle synthesis*. *Pharm Res*, 2015. **32**(6): S. 1859-1863.
129. Schubert, S., Delaney, J.J.T., and Schubert, U.S., *Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid)*. *Soft Matter*, 2011. **7**(5): S. 1581-1588.
130. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., and Benita, S., *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1989. **55**: S. 25-28.
131. Ganachaud, F. and Katz, J.L., *Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices*. *Chemphyschem*, 2005. **6**(2): S. 209-216.
132. Horisawa, E., Kubota, K., Tuboi, I., Sato, K., Yamamoto, H., Takeuchi, H., and Kawashima, Y., *Size-Dependency of DL-Lactide/Glycolide Copolymer Particulates for Intra-Articular Delivery System on Phagocytosis in Rat Synovium*. *Pharmaceutical Research*, 2002. **19**(2): S. 132-139.
133. Weiss, B., Schaefer, U.F., Zapp, J., Lamprecht, A., Stallmach, A., and Lehr, C.M., *Nanoparticles made of fluorescence-labelled poly(L-lactide-co-glycolide): Preparation, stability, and biocompatibility*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2006. **6**(9-10): S. 3048-3056.
134. Wu, N., Zhang, X., Li, F., Zhang, T., Gan, Y., and Li, J., *Spray-dried powders enhance vaginal siRNA delivery by potentially modulating the mucus molecular sieve structure*. *Int J Nanomedicine*, 2015. **10**: S. 5383-5396.
135. Dunnhaupt, S., Barthelmes, J., Hombach, J., Sakloetsakun, D., Arkhipova, V., and Bernkop-Schnurch, A., *Distribution of thiolated mucoadhesive nanoparticles on intestinal mucosa*. *Int J Pharm*, 2011. **408**(1-2): S. 191-199.
136. Kucheryavy, P., He, J., John, V.T., Maharjan, P., Spinu, L., Goloverda, G.Z., and Kolesnichenko, V.L., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles with variable size and an iron oxidation state as prospective imaging agents*. *Langmuir*, 2013. **29**(2): S. 710-716.
137. Mahdavi, M., Ahmad, M.B., Haron, M.J., Namvar, F., Nadi, B., Rahman, M.Z., and Amin, J., *Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. *Molecules*, 2013. **18**(7): S. 7533-7548.

138. Cornell, R.M. and Schwertmann, U., *Introduction to the Iron Oxides*, in *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, R.M. Cornell and U. Schwertmann, Editors. 2003, Wiley-VCH Verlag S. 1-7.
139. Yuen, A.K., Hutton, G.A., Masters, A.F., and Maschmeyer, T., *The interplay of catechol ligands with nanoparticulate iron oxides*. Dalton Trans, 2012. **41**(9): S. 2545-2559.
140. Gomez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., and Delgado, A.V., *Synthesis and Characterization of Spherical Magnetite/Biodegradable Polymer Composite Particles*. J Colloid Interface Sci, 2001. **240**(1): S. 40-47.
141. Yang, J., Lee, H., Hyung, W., Park, S.B., and Haam, S., *Magnetic PECA nanoparticles as drug carriers for targeted delivery: Synthesis and release characteristics*. Journal of Microencapsulation, 2006. **23**(2): S. 203-212.
142. Zhao, D.-L., Zeng, X.-W., Xia, Q.-S., and Tang, J.-T., *Preparation and coercivity and saturation magnetization dependence of inductive heating property of Fe₃O₄ nanoparticles in an alternating current magnetic field for localized hyperthermia*. Journal of Alloys and Compounds, 2009. **469**(1-2): S. 215-218.
143. MacDonald, C., Friedman, G., Alamia, J., Barbee, K., and Polyak, B., *Time-varied magnetic field enhances transport of magnetic nanoparticles in viscous gel*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(1): S. 65-76.
144. Davis, K., Qi, B., Witmer, M., Kitchens, C.L., Powell, B.A., and Mefford, O.T., *Quantitative measurement of ligand exchange on iron oxides via radiolabeled oleic acid*. Langmuir, 2014. **30**(36): S. 10918-10925.
145. Obaidat, I., Issa, B., and Haik, Y., *Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia*. Nanomaterials, 2015. **5**(1): S. 63-89.
146. Sadat, M.E., Patel, R., Sookoor, J., Bud'ko, S.L., Ewing, R.C., Zhang, J., Xu, H., Wang, Y., Pauletti, G.M., Mast, D.B., and Shi, D., *Effect of spatial confinement on magnetic hyperthermia via dipolar interactions in Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **42**: S. 52-63.
147. Shah, R.R., Davis, T.P., Glover, A.L., Nikles, D.E., and Brazel, C.S., *Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia*. J Magn Magn Mater, 2015. **387**: S. 96-106.
148. de la Presa, P., Luengo, Y., Multigner, M., Costo, R., Morales, M.P., Rivero, G., and Hernando, A., *Study of Heating Efficiency as a Function of Concentration, Size, and Applied Field in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, 2012. **116**(48): S. 25602-25610.
149. Natividad, E., Castro, M., and Mediano, A., *Adiabatic vs. non-adiabatic determination of specific absorption rate of ferrofluids*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. **321**(10): S. 1497-1500.
150. Coisson, M., Barrera, G., Celegato, F., Martino, L., Vinai, F., Martino, P., Ferraro, G., and Tiberto, P., *Specific absorption rate determination of magnetic nanoparticles through hyperthermia measurements in non-adiabatic conditions*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2015. **415**: S. 2-6.
151. Shah, R.R., Dombrowsky, A.R., Paulson, A.L., Johnson, M.P., Nikles, D.E., and Brazel, C.S., *Determining iron oxide nanoparticle heating efficiency and elucidating*

- local nanoparticle temperature for application in agarose gel-based tumor model.* Mater Sci Eng C Mater Biol Appl., 2016. **68**: S. 18-29.
152. Riedinger, A., Guardia, P., Curcio, A., Garcia, M.A., Cingolani, R., Manna, L., and Pellegrino, T., *Subnanometer local temperature probing and remotely controlled drug release based on azo-functionalized iron oxide nanoparticles.* Nano Lett, 2013. **13**(6): S. 2399-2406.
153. Dias, J.T., Moros, M., Del Pino, P., Rivera, S., Grazu, V., and de la Fuente, J.M., *DNA as a molecular local thermal probe for the analysis of magnetic hyperthermia.* Angewandte Chemie- Internationale Edition, 2013. **52**(44): S. 11526-11529.
154. Polo-Corrales, L. and Rinaldi, C., *Monitoring iron oxide nanoparticle surface temperature in an alternating magnetic field using thermoresponsive fluorescent polymers.* Journal of Applied Physics, 2012. **111**(7): S. 334.
155. Bouchemal, K., Aka-Any-Grah, A., Dereuddre-Bosquet, N., Martin, L., Lievin-Le-Moal, V., Le Grand, R., Nicolas, V., Gibellini, D., Lembo, D., Pous, C., Koffi, A., and Ponchel, G., *Thermosensitive and mucoadhesive pluronic-hydroxypropylmethylcellulose hydrogel containing the mini-CD4 M48U1 is a promising efficient barrier against HIV diffusion through macaque cervicovaginal mucus.* Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(4): S. 2215-2222.
156. Lai, S.K., Wang, Y.Y., Hida, K., Cone, R., and Hanes, J., *Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(2): S. 598-603.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen:

Shi, C.*, **Thum, C.***, Zhang, Q., Tu, W., Pelaz, B., Parak, W. J., Zhang, Y., Schneider, M., *Inhibition of the cancer-associated TASK 3 channels by magnetically induced thermal release of Tetrandrine from a polymeric drug carrier*. Journal of Controlled Release, 2016. 237: S. 50-60.

Rietscher, R.*, **Thum, C.***, Lehr, C.-M., Schneider, M., *Semi-automated nanoprecipitation-system – an option for operator independent, scalable and size adjustable nanoparticle synthesis*. Pharmaceutical Research, 2015. 32 (6): S. 1859-1863.

*gleichwertige Erstautoren

Tagungsbeiträge, Vorträge:

- **Thum, C.**, Schneider, M., *Novel approach and first attempt to overcome mucus barrier by using heat*, CRS German Chapter Meeting, Marburg, Deutschland, 2017.
- **Thum, C.**, Schneider M., *Magnetite loaded PLGA NPs as a powerful combination for Drug Delivery purposes*, GPEN Meeting, Lawrence, Kansas, USA, 2016.

Tagungsbeiträge, Poster:

- **Thum, C.**, Schneider, M., *Composite system to overcome the mucus barrier – magnetite-loaded PLGA carriers*, DPhG-Doktoranden-/ Postdocstagung 2017, Frankfurt am Main, Deutschland, 2017.
- **Thum, C.**, Shi, C., Zhang, Q., Tu, W., Pelaz, B., Parak, W. J., Zhang, Y., Schneider, M., *Tetrandrine carrying magnetic PLGA NPs: basis for a novel approach to inhibit a cancer-associated TASK3 channel by a heat triggered Tet release*, BioBarriers 2016, Saarbrücken, Deutschland, 2016.
- **Thum, C.**, Shi, C., Zhang, Q., Tu, W., Pelaz, B., Parak, W. J., Zhang, Y., Schneider, M., *Tetrandrine loaded magnetic PLGA NPs: a promising tool for a novel approach to the treatment of various cancer types, associated with an overexpression of the TASK 3 channel*, Doktorandentag der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland, 2016.
- **Thum, C.**, Schneider, M., *Magnetite loaded PLGA-NPs – a combo with unique properties for Drug Delivery*, CRS German Chapter Meeting, Muttentz, Schweiz, 2015.

- **Thum, C.**, Schneider, M., *Magnetite meets PLGA: a Nanoparticle System with unique properties for Drug Delivery purposes*, Size Matters 2015, Saarbrücken, Deutschland, 2015.
- **Thum, C.**, Rietscher, R., Lehr, C.-M., Schneider, M., *Semi-automated nanoprecipitation system for the formulation of protein loaded PLGA Nanoparticles*, PBP World Meeting, Lissabon, Portugal, 2014.